

---

# Isolamento de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos (*Columba livia*) em praças públicas de São José dos Campos-SP

*Isolation of Cryptococcus neoformans in pigeons (Columba livia) droppings in São José dos Campos-SP public squares*

Maria Fernanda de Paula Ribeiro<sup>1</sup>, Adriano Moraes da Silva<sup>1</sup>, Wendel Simões Fernandes<sup>1</sup>, Miriam Marcolan de Mello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Curso de Biomedicina da Universidade Paulista, São José dos Campos-SP, Brasil.

---

## Resumo

**Objetivo** – Identificar a presença de *Cryptococcus neoformans* em amostras de fezes secas de pombos em diferentes praças da região central de São José dos Campos – SP. **Métodos** – Para a elaboração da pesquisa foi realizada a identificação de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos utilizando microscopia das fezes em suspensão com solução fisiológica 0,9% com tinta da China, com posterior semeadura em meio Ágar Sabouraud dextrosado a 2%, e incubadas em estufa bacteriológica à 30°C por 5 dias. Após esse período realizou-se o exame direto das colônias das amostras por meio da montagem de lâminas com tinta da China para observação em microscópio óptico. **Resultados** – Identificou-se e verificou-se o crescimento de *Cryptococcus neoformans* e *Candida sp.* em amostras de fezes de pombos, tendo assim potenciais focos de contaminação, no local de origem das amostras positivas. **Conclusão** – Comprova-se a presença de *Cryptococcus neoformans* em uma das três praças e a presença de *Candida sp.* em duas das três praças analisadas. Desse modo, espera-se que os resultados dessa pesquisa contribuam para a implementação de uma estratégia de controle da população de pombos buscando minimizar os riscos de contaminação humana.

**Descritores:** *Cryptococcus neoformans*; Criptococose diagnóstico; *Cryptococcus* isolamento; *Cryptococcus*/imunologia; Epidemiologia

## Abstract

**Objective** – To identify the presence of *Cryptococcus neoformans* in samples of dried feces of pigeons in different squares of the central region of São José dos Campos-SP. **Methods** – The identification of *Cryptococcus neoformans* in pigeon stools using microscopic feces in suspension with 0.9% physiological solution with Chinese ink was carried out, with subsequent seeding in 2% dextrose Agar Sabouraud medium and incubated in a bacteriological oven at 30°C for 5 days. After this period, the colonies of the samples were directly examined by the assembly of slides with Chinese ink for optical microscope observation. **Results** – *Cryptococcus neoformans* and *Candida sp.* were identified and grown. In faeces samples from pigeons, thus having potential foci of contamination at the origin site of the positive samples. **Conclusion** – The presence of *Cryptococcus neoformans* in one of the three squares and the presence of *Candida sp.* in two of the three squares analyzed. Thus, it is expected that the results of this research contribute to the implementation of a strategy to control the pigeon population in order to minimize the risks of human contamination.

**Descriptors:** *Cryptococcus neoformans*; Cryptococcosis diagnosis; *Cryptococcus* isolation; *Cryptococcus* immunology; Epidemiology

---

## Introdução

*Cryptococcus neoformans* é identificado como um fungo responsável por infecções sistêmicas principalmente em pacientes imunocomprometidos. Micro-organismo eucariótico, agrupado no Reino Fungi, é a forma assexuada do basidiomiceto *Filobasidiella neoformans*, apresenta-se como uma levedura oval, envolta por uma cápsula polissacarídica, se reproduz por brotamento e cresce em forma de células únicas. É uma levedura encapsulada, identificada como patógeno humano desde 1894, podendo ser encontrado tanto em substratos de origem animal quanto vegetal<sup>1-3,5,8-10,12,17,19,21</sup>.

*C. neoformans* se manifesta em sorotipos A, B, C, D e AD, classificados como *C. neoformans var neoformans* (A, D e AD), *C. neoformans var gattii* (B e C) e *C. neoformans var grubii* (A), se distinguem pelos aspectos bioquímicos, genéticos, antigênicos e ecológicos. A variedade *neoformans* tem distribuição cosmopolita, encontrada em solos contaminados com fezes de aves, madeira em decomposição ou até mesmo em árvores, o que sugere um novo habitat natural. Este fungo é en-

contrado nessas árvores associado ao contato das aves com seus troncos e galhos<sup>2,4,7-9,13,15-18,21</sup>.

*Cryptococcus neoformans* é causador da criptococose, uma doença fúngica de maior risco à vida de pacientes imunocomprometidos, especialmente da meningite criptocócica. Essa infecção se dá por meio da inalação de propágulos, representado por leveduras desidratadas, de diâmetro menor que 2µm. Esse micro-organismo pode causar infecção em indivíduos saudáveis, porém, a maior proporção ocorre em indivíduos imunocomprometidos. Entende-se por imunocomprometidos indivíduos portadores de algum tipo de imunodeficiência, seja imunodepressão seja por causa patológica, como o portador do vírus HIV ou paciente com câncer; ou imunossupressão que tem como causa o uso medicamentoso ou pacientes transplantados. O primeiro estágio da doença se manifesta como uma infecção do sistema respiratório, podendo ser aguda, subaguda ou crônica. Pode se manifestar como uma infecção secundária quando disseminada para o sistema nervoso central acarretando quadros de meningite, encefalite e menin-

goencefalite. Geralmente a infecção pulmonar é assintomática, esse micro-organismo causa síndrome similar à gripe ou produz pneumonia. Por meio da corrente sanguínea se dissemina até as meninges. A demora na terapia adequada é associada ao aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes acometidos<sup>1,3,5,7-12,14-15,17-18,20</sup>.

A patogenicidade do *C. neoformans* está relacionada às características da infecção no hospedeiro e capacidade do parasita nele, e aos fatores de virulência afetando o grau de patogenicidade. Sua cápsula polissacarídica é um fator de virulência, ela atua na resistência à fagocitose, acarretando a diminuição da resposta imunológica<sup>2,15</sup>.

Amplamente distribuída na natureza, essa levedura cresce de forma abundante em solos onde contém excremento de aves, especialmente pombos, onde os fungos mantêm-se viável para contágio por até dois anos. Porém, por ser apenas um parasita natural da mucosa do papo dos pombos, as aves não são infectadas, sendo vistas apenas como fonte de transmissão. Sendo assim o *Cryptococcus spp.* é um agente endossaprófito natural dos pombos, as fezes dos pombos servem como fonte nutritiva para o *Cryptococcus*. A infecção humana é dada através da inalação de células de levedura que ficam em suspensão no meio ambiente. O micro-organismo tem tamanho compatível para transpor barreiras do trato respiratório e se depositar nos alvéolos pulmonares. Não ocorre transmissão entre humanos<sup>2-3,5,14,17-19,21</sup>.

Há na região uma carência de dados sobre a epidemiologia e vias de infecção da criptococose, o que justifica o interesse em mostrar para a população que esses micro-organismos estão mais próximos do que podemos imaginar, visando contribuir para um melhor entendimento acerca da população.

Por ser uma micose cosmopolita, a criptococose assume um importante papel dentre as infecções fúngicas, especialmente por afetar de forma relacionada à imunidade do paciente, assim sendo, em sua grande maioria pacientes imunodeficientes. Portanto, torna-se de grande importância colaborar com informações para que medidas de controle da disseminação do fungo sejam tomadas. Como por exemplo, o controle da população de pombos em áreas urbanas, por ser um dos principais reservatórios. A precária situação de higiene em alguns locais públicos propicia a infecção inclusive de outros fungos de caráter oportunista, como a *Candida spp.*, sendo assim um provável risco ao público usuário de por exemplo praças públicas.

A realização desta pesquisa teve como objetivo coletar amostras secas de fezes de pombos em 3 praças públicas na região central de São José dos Campos-SP, sendo 5 amostras em cada uma delas, e submetê-las à análise qualitativa para identificar a presença de *Cryptococcus neoformans*.

## Métodos

As amostras de fezes de pombos foram colhidas no dia 5 de maio de 2016, na Praça Monsenhor Ascânio Brandão (Praça São Dimas), Parque Santos Dumont e

Parque Vicentina Aranha, localizados na região central da cidade de São José dos Campos-SP. Todos os locais investigados têm grande fluxo de pessoas diariamente. Com o auxílio de máscara e luvas, foram utilizados frascos e espátulas estéreis para colheita de material. De cada praça foram colhidas 5 amostras, um total de 15, e levadas para o laboratório de análises clínicas da Universidade Paulista-UNIP, Campus SJC, procedimento realizado dia 6 de maio de 2016.

Esse trabalho foi baseado utilizando a metodologia adaptada por Silva *et al.* (2008)<sup>22</sup> e Contin *et al.* (2011)<sup>23</sup>. Metodologia também utilizada para identificação de *Cryptococcus sp.* em outras pesquisas<sup>1,2,6,8</sup>.

– Amostras de fezes secas de pombos foram coletadas e acondicionadas em frascos estéreis, em temperatura ambiente, por menos de 24 horas;

– O material foi processado em câmara de fluxo laminar; triturado e homogeneizado com pistilo de porcelana, também estéril;

– 0,5g do material foi homogeneizado e suspenso em 5mL de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%;

– Agitado em vórtex por 3 minutos e repousado por 30 minutos, à temperatura ambiente;

– Desse material foi semeado 0,1mL do sobrenadante, em placa de Petri com agar Sabouraud Dextrose (ASD) acrescido de cloranfenicol, as culturas foram semeadas por esgotamento, em triplicata para validação, foram processadas em total 45 placas;

– As placas foram armazenadas em estufa à 30°C por 5 dias. Sendo visualizada diariamente a presença de colônias características.

### Exame direto:

Para primeira avaliação, de exame direto, foi utilizado o método de visualização por tinta da China.

Da suspensão obtida para a cultura, 100 $\mu$ l dela foi misturado a 50 $\mu$ l de tinta Nanquim em lâminas, sobrepostas por lamínulas e visualizadas em microscópio óptico.

Exame direto de amostra retirada das culturas crescidas das placas de Petri:

Após 48h identificou-se colônias características de cor creme em crescimento no meio, e seguiu-se novamente a microscopia utilizando tinta da China diretamente da colônia.

Uma pequena amostra da colônia foi homogeneizada com 50 $\mu$ l de solução fisiológica e 50 $\mu$ l de tinta da China em lâminas, sobrepostas por lamínulas e visualizadas em microscópio óptico.

## Resultados e Discussão

Os resultados desta pesquisa confirmam isolamento de *Cryptococcus neoformans* e *Candida sp.*

Nos últimos 20 anos, a maioria dos estudos realizados comprovaram que a incidência de infecções causadas por *Cryptococcus neoformans* e *Candida spp.* tem aumentado em pessoas expostas à excretas de aves. Fato que sugere procedimentos constantes de limpeza e desinfecção de locais com acúmulo de fezes de aves, por ser uma medida eficaz no controle epidemiológico<sup>18</sup>.

Foi realizado exame direto das amostras por meio de montagem de lâminas com tinta da China e observado ao microscópio óptico. A presença de levedura com forma regular, encapsulada, globosa e arredondada sugeriu existência de *Cryptococcus neoformans* nas amostras coletadas do Parque Santos Dumont. Nas demais, do Parque Vicentina Aranha e Praça Monsenhor Ascânio Brandão (Praça São Dimas), a análise direta foi negativa para *Cryptococcus neoformans*.

Após semeadura, as colônias também foram observadas por meio da técnica de exame direto por tinta da China para identificação. Foram identificadas colônias de coloração creme, úmidas, de aspecto brilhante, textura mucóide e margem lisa nas amostras do Parque Santos Dumont. Não houve crescimento microbiológico característico de *Cryptococcus neoformans* nas amostras do Parque Vicentina Aranha e Praça Monsenhor Ascânio Brandão (Praça São Dimas).

As amostras coletadas do Parque Santos Dumont foram positivas para *Cryptococcus neoformans* (Figura 1) com cerca de 15 colônias em cada placa, porém, outra levedura foi isolada de forma predominante, colônias de *Candida sp.* Nas amostras do Parque Vicentina Aranha foram observadas predomínio de *Candida sp.* Não foram identificadas colônias nas amostras da Praça Monsenhor Ascânio Brandão e Praça São Dimas, pois não houve crescimento de micro-organismos após 5 dias de crescimento. A adição de cloranfenicol (no meio de cultura impediu o crescimento de quaisquer bactérias nos meios, facilitando assim apenas o crescimento dos fungos, objetivo pelo qual o trabalho foi realizado).

Na Tabela 1, pode-se identificar os locais de coleta e seus respectivos achados em microscopia e cultura.

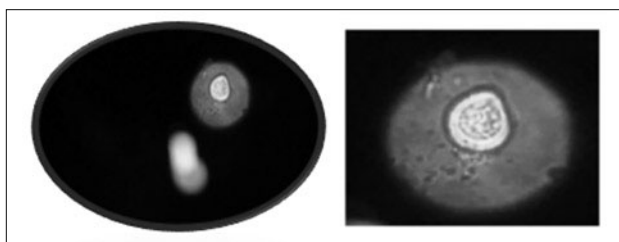


Figura 1. Microscopia óptica de *Cryptococcus neoformans* utilizando tinta da China, em objetiva de 100, em amostra de fezes secas colhidas do Parque Santos Dumont

Epidemiologicamente, *Cryptococcus neoformans* pode ser encontrado em diferentes regiões geográficas, porém, preferencialmente em regiões de clima tropical ou subtropical. No Brasil há uma grande variedade de estudos que comprovam sua presença em diferentes regiões. Estudos correlacionados utilizados para comparação com o resultado obtido nessa pesquisa registraram a presença de *C. neoformans* em diferentes quantidades em locais tais como Pelotas-RS (26,9%)<sup>14</sup>, Porto Alegre-RS (100%)<sup>2</sup>, Lages-SC (67,2%)<sup>26</sup>, Florianópolis-SC (10%)<sup>25</sup>, Ribeirão Preto-SP (75%)<sup>22</sup>, Santos-SP (13,9%)<sup>28</sup>, Rio de Janeiro-RJ (37,8%)<sup>24</sup>, Caratinga-MG (90%)<sup>23</sup>, Alfenas-MG (36,3%)<sup>13</sup>, Campo Grande-MS (50%)<sup>17</sup> e Goiânia-GO (23,2%)<sup>27</sup>.

As porcentagens positivas obtidas nesses estudos variaram de uma frequência de 10% em Florianópolis-SC até 100% em Porto Alegre-RS. Essa variação se dá devido às condições meteorológicas de cada região. A temperatura ambiente influencia diretamente no crescimento de micro-organismos, quanto mais úmido e mais quente, maior a proliferação fúngica. Sendo assim, a região, data, tipo de amostra (fezes secas ou úmidas) no momento da coleta e até a quantidade colhida determinam essa variação do resultado<sup>2,18,21,28</sup>.

Nos casos de Santos (13,9%) e Florianópolis (10%), por exemplo, por serem cidades litorâneas, o baixo isolamento e identificação do agente provavelmente esteve relacionada à temperatura média elevada combinada à exposição direta à radiação solar, uma vez que altas temperaturas (30°C) são menos favoráveis à sobrevivência do fungo, onde atribui-se a altitude entre 2000 e 3000m e o clima frio como fatores favoráveis ao desenvolvimento do *Cryptococcus sp.*, fatores esses opostos as cidades litorâneas<sup>18,21,25,28</sup>.

Porto Alegre atingiu 100% de amostras positivas. O estudo foi realizado no mês de outubro, que está entre os meses que se iniciam as temperaturas quentes do ano, porém, é uma cidade de clima subtropical úmido. Além do mais, é bastante arborizada e como podemos constatar em diversos estudos, *Cryptococcus neoformans* é encontrado em solos contaminados com fezes de pombo, troncos de árvores e madeira em decomposição<sup>2,18,21</sup>.

Deve-se considerar que no dia da colheita das amostras, a cidade de São José dos Campos passava por um período de baixa umidade, temperatura de aproximadamente 27°C e escassez de chuva. A elevada temperatura e baixa umidade são fatores que cooperam com

Tabela 1. Resultados obtidos em análises do material.

Local	Exame direto Tinta da China (Nanquim)	Crescimento (Ágar Sabouraud Dextrose/cloranfenicol)	Exame direto Tinta da China das (Direto das Colônias)
Parque Santos Dumont	Positivo	Colônias de cor creme, arredondadas e brilhantes	<i>Candida sp.</i> e <i>Cryptococcus sp.</i>
Parque Vicentina Aranha	Negativo	Colônias de cor creme, arredondadas	<i>Candida sp.</i>
Praça Monsenhor Ascânio Brandão (São Dimas)	Negativo	Não houve crescimento de colônias	Não foi observado

a inativação do micro-organismo no ambiente, desse modo a viabilidade das leveduras no ambiente é diminuída. Portanto, mesmo onde não houve crescimento microbiológico, a levedura pode ser encontrada em outras épocas do ano.

De acordo com os resultados obtidos e dados da literatura, podemos evidenciar que a presença de *Cryptococcus neoformans* em áreas urbanas pode ser considerada um potencial risco para a população, pois ocorre em locais com acúmulo de fezes de pombos. O aumento da população de pombos se dá devido às condições propícias para a alimentação das aves e construção de ninhos.

Espera-se que os resultados obtidos neste estudo venham a contribuir para que medidas preventivas sejam tomadas com o propósito de diminuir os riscos de contaminação humana. Supondo ao menos a implementação de uma estratégia de controle da população de pombos, que é a principal fonte de transmissão da criptococose.

## Conclusão

Comprova-se a presença de *Cryptococcus neoformans* em uma das três praças e a presença de *Candida sp.* em duas das três praças analisadas. Desse modo, com os resultados dessa pesquisa, sugere-se a realização de experimentos similares em outras épocas do ano, resultados que deveriam contribuir junto com este estudo na implementação de uma estratégia de controle da população de pombos buscando minimizar os riscos de contaminação da população da região.

## Referências

1. Levinson W. Microbiologia médica e imunologia. 10.<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
2. Reolon A, Perez LRR, Mezzari A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. J Bras Patol Med Lab. 2004;40(5):293-8.
3. Casali AK, Staats CC, Schrank A, Vainstein MH. Aspectos moleculares e epidemiológicos. Biotecnol Ciênc & Desenvol. 2001(2):34-7.
4. Severo CB, Gazzoni AF, Severo LC. Criptococose pulmonar. J Bras Pneumonia. 2009;35(11):1136-44.
5. Barbosa ATF, Colares FA, Gusmão ES, Barros AA, Cordeiro CG, Andrade MCT. Criptococose pulmonar isolada em paciente imunocompetente. J Bras Pneumol. 2006;32(5):476-80.
6. Costa AKF. Análise fenotípica e molecular de cepas de *Cryptococcus spp.* obtidas de fontes ambientais e clínicas. [tese de doutorado]. Fortaleza: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará; 2009.
7. Nweze EI, Kechia FA, Dibua UE, Eze C, Onoja US. Isolation of from environmental samples collected in Southeastern Nigeria. Rev Inst Med Trop. 2015;57(4):295-8.
8. Krangvichain P, Niyomtham W, Prapasarakul N. Occurrence and susceptibilities to disinfectants of in fecal droppings from pigeons in Bangkok. J Vet Med Sci. 2016;78(3):391-6.
9. Fernandes OFL, Costa TR, Costa MR, Soares AJ. Isolados em pacientes com AIDS. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33(1):75-8.

10. Kon AS, Grumach AS, Colombo AL, Penalva ACO, Wanke B, Telles FDQ. Consenso em criptococose. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(5):524-44.
11. Papallardo MC, Melhem MS. *Cryptococcosis*: a review of the brazilian experience for the disease. Rev Inst Med Trop. 2003;45(6):299-305.
12. Pereira TCD, Barros RAM. *Cryptococcus gattii*: Perspectivas sobre a ecoepidemiologia e novos nichos ecológicos. Rev Facider. 2012;1.
13. Carvalho VG, Terceti MS, Dias ALT, Paula CR, Lyon JP, Siqueira AM, et al. Caracterização de sorotipo e "mating type" por PCR Multiplex. Rev Inst Med Trop. 2007;49(4):207-10.
14. Faria RO, Nascente PS, Meinerz ARM, Cleff MB, Antunes TA, Silveira ES. Ocorrência de *Cryptococcus* em excretas de pombos na cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(2):198-200.
15. Pedroso RS, Costa KRC, Ferreira JC, Candido RC. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. Rev Soc Bras Med Trop. 2007;40(5):566-8.
16. Drummond ED, Reimão JQ, Dias ALT, Siqueira AM. Comportamento de amostras ambientais e clínicas de frente a fungicidas de uso agrônomico e ao fluconazol. Rev Soc Bras Med Trop. 2007;40(2):209-11.
17. Filiú WFO, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lazéra M. Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Soc Bra Med Trop. 2002;35(6):591-5.
18. Colombo G, Táparo CV, Araújo Júnior EC, Makatu MY, Santos FS, Marinho M. Caracterização bioquímica e molecular de *Cryptococcus spp.* isolados de excretas ambientais de pombos (*Columba livia* doméstica). Arq Bras Med Vet Zootec. 2015;67(6):1639-45.
19. Machado CC, Amaral AA, Severo LC. *Cryptococcus neoformans* isolado do solo. Rev Inst Med Trop. 1993;35(1):77-9.
20. Lima CT, Klafke GB, Xavier MO. *Cryptococcus spp.* em excretas de *Columba livia* (pombos domésticos) provenientes de um hospital universitário no Sul do Brasil. Arq Inst Biol. 2015;82.
21. Araújo Júnior EC, Táparo CV, Uchida CY, Marinho M. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. Arq Bras Med Vet. Zootec. 2015 jul/ago;67(4):1003-8.
22. Silva JO, Capuano DM. Ocorrência de *Cryptococcus spp* e de parasitas de interesse em saúde pública, nos excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Rev Inst Adolfo Lutz. 2008;67(2):137-41.
23. Contin JT, Quaresma GS, Silva EF, Linardi VR. Ocorrência de *Cryptococcus* em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG – Brasil. Rev Med Minas Gerais. 2011;21(1):19-24.
24. Baroni FA, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTBD. *Cryptococcus neoformans* em torres de igrejas da cidade do Rio de Janeiro-RJ, Brasil. Rev Inst Med Trop. 2006;48(2):71-5.
25. Garcia LC. Estudo genotípico de *Cryptococcus neoformans* isolados de amostras ambientais no Município de Florianópolis, Santa Catarina. (trabalho de conclusão de curso). Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2008.
26. Scain G. Prevalência de *Cryptococcus spp* obtidas de fontes ambientais e clínicas em fezes de pombos (*Columba livia*) nas praças públicas da cidade de Lages, Santa Catarina. (Monografia pós-graduação) Lajes-SC: Diretoria de Pós-Graduação da Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2011.

27. Kobayashi CCBA, Souza LKH, Fernandes OFL, Brito SCA, Silva AC, Sousa ED. Caracterização de isolados *Cryptococcus neoformans* de fontes ambientais urbanas na cidade de Goiânia, estado de Goiás, Brasil. Rev Inst Med Trop. 2005;n7(4):203-7.

28. 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. 2004;47(1): 31-6.

**Endereço de correspondência:**

Miriam Marcolan de Mello  
Rua Heitor Vieira Júnior, 191 – apto 43A – Altos do Esplanada  
São José dos Campos, SP – CEP 12246-013  
Brasil

E-mail: marcolanmirian@yahoo.com.br

Recebido em 8 de novembro de 2016

Aceito em 21 de fevereiro de 2017