

Cryptococcus spp. EM UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE: UM ALERTA

Otávio Moreli Carneiro Monteiro^{1*}, Dario Correa Junior², Marilene Rodrigues Chang³

1. Estudante da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMED-UFMS)

2. Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias (PPGDIP-UFMS)

3. Professor da FACFAN-UFMS - Departamento de Microbiologia Clínica

Resumo

Cryptococcus do complexo *C. neoformans* e *C. gattii* são agentes da criptococose, doença fúngica que acomete primeiramente o pulmão e se dissemina por via hematogênica para outros sistemas, com predileção pelo sistema nervoso central. Os pombos (*Columba livia*) são reservatórios urbanos e suas fezes, um ambiente propício para o crescimento e manutenção de uma fonte de disseminação. O objetivo desse estudo foi investigar *Cryptococcus* spp. em unidades básicas de saúde (UBS) que continham excrementos de pombos. A identificação dos micro-organismos foi feita por meio de técnicas fenotípicas (ágar níger e CGB) e a suscetibilidade antifúngica por meio da técnica de microdiluição. De 27 UBS visitadas em 13 foram observados excrementos. Um total de cinco *C. gatti* foram isolados de duas UBS. Esses resultados fornecem subsídios à administração pública para pleitearem medidas de controle dessas aves diminuindo assim os riscos de infecções para os usuários já debilitados e para a comunidade em geral.

Autorização legal: C.I. N. 21.476/GEP/SESAU/2018

Palavras-chave: Criptococose; Monitoramento Epidemiológico; Atenção Primária à Saúde;

Apoio financeiro: CNPq

Introdução

Cryptococcus são fungos encapsulados pertencentes aos complexos *C. neoformans* – que possui os tipos moleculares VNI, VNII, VNIII e VNIV – e ao complexo *C. gattii* – composto pelos tipos VGI, VGII, VGIII e VGIV (FANG et al., 2015; KWON-CHUNG, 2017). A doença causada por esses fungos é a criptococose, que se instala por meio da inalação de propágulos fúngicos dispersos no ambiente. Normalmente, a doença se inicia no pulmão e via corrente sanguínea dissemina-se para outros sítios, com tropismo pelo sistema nervoso central (CHAYAKULKEEREE, 2006).

Espécies do complexo *C. neoformans* são patógenos oportunistas, tendo maior incidência em pacientes imunocomprometidos. Em todo mundo ocorre quase um milhão de casos por ano e estão associados a elevada letalidade (PARK et al., 2009; KRONSTAD et al., 2011; ARMSTRONG-JAMES et al., 2014). Embora a infecção pelo *C. gatti* ocorra em sua maioria em pacientes imunocompetentes, também esta associada a elevada taxa de letalidade (MORETTI et al., 2008).

As aves são consideradas vetor mecânico desses fungos. Os pombos (*Columba livia*) estão bem adaptado no ambiente urbano e disseminam por meio das suas fezes, os esporos fúngicos (CASADEVALL & PERFECT, 1998; LIN & HEITMAN, 2006).

No Brasil, trabalhos que descrevem isolamento ambiental destas leveduras se concentram na região Sul e Sudeste (AMARO, 2006; MORA et al., 2012; FARIA et al., 2010). Em 2002, Filiú et al. obtiveram 50% de positividade para *Cryptococcus neoformans* em amostras ambientais coletadas em Campo Grande – MS. Somase a isso, uma alta taxa de letalidade por criptococose descrita em Mato Grosso do Sul: 51% em portadores de HIV e 41% na população HIV-negativa (LINDENBERG et al., 2008).

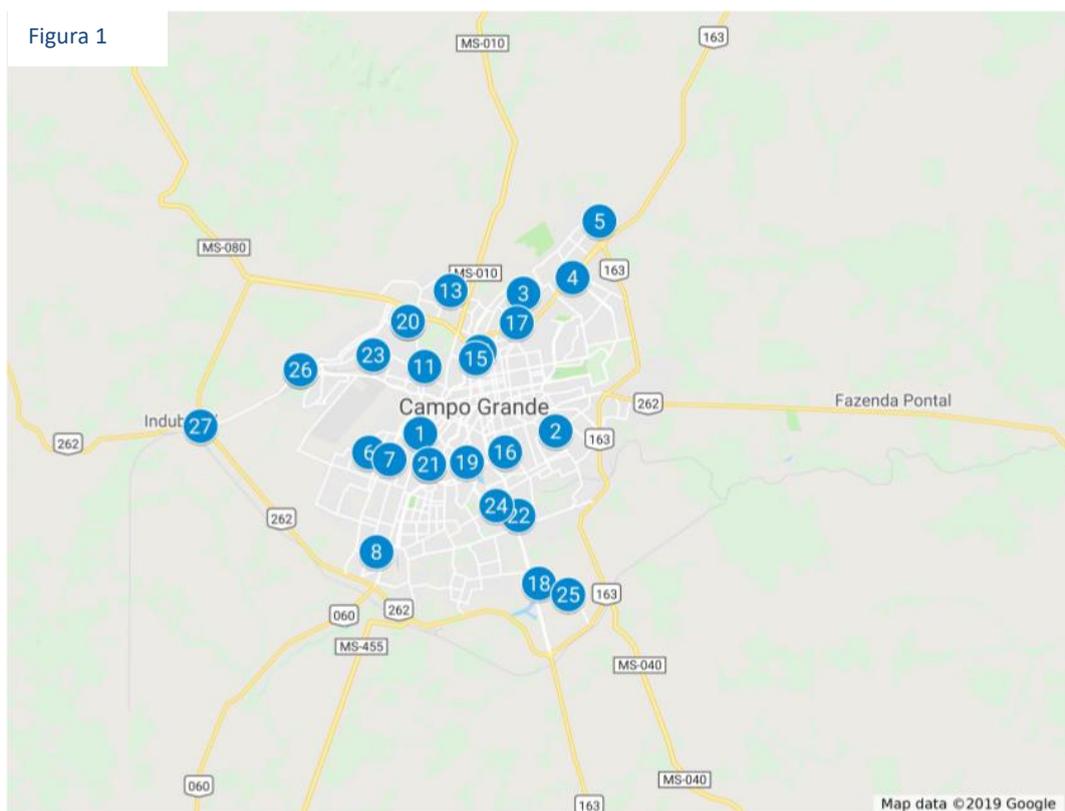
Deste modo, percebe-se que há um lapso de quase duas décadas na vigilância epidemiológica dessa levedura no estado de Mato Grosso do Sul. Isso abre espaço para políticas públicas inadequadas, surtos da criptococose no estado e falta de um panorama epidemiológico para guiar os profissionais da saúde no diagnóstico diferencial, principalmente em indivíduos imunossuprimidos. Neste sentido, visa-se minimizar essa lacuna de conhecimento por meio desse trabalho. Para isso, analisou-se os excrementos de pombos encontrados em unidades básicas de saúde da rede municipal em busca destes patógenos.

Metodologia

A coleta de amostras ambientais (excrementos de pombos) foi realizada em Unidades Básicas de Saúde da área urbana do município de Campo Grande, capital do Mato Grosso do Sul, no período de outubro a dezembro de 2018. A figura 1 mostra a localização das 27 UBS visitadas. A identificação das UBS foi feita de forma numérica (1 a 27) e os nomes omitidos por questões éticas.

De cada Unidade Básica de Saúde, foram coletadas 10 amostras de áreas internas e/ou externas. Caso não houvesse material para ser coletado a unidade foi classificada como “limpa”. Para a coleta dos excrementos utilizou-se coletores universais e espátulas estéreis. Após a coleta, essas amostras foram encaminhadas para processamento no Laboratório de Pesquisas Microbiológicas da FACFAN/UFMS e acondicionadas sob

refrigeração entre 8 e 12°C até serem utilizadas



Localização das Unidades Básicas de Saúde no município de Campo Grande (MS)

O processamento consistiu na pesagem dos excrementos e para cada 1 grama de excreta adicionou-se 50 mL de solução salina (0,9%) esterilizada, acrescida de cloranfenicol (0,4g/L). Em seguida, a mistura foi submetida a agitação em vortex por 3 min. Após repouso, 100 µL do sobrenadante foi semeado em placas de ágar niger contendo clorafenicol (0,05g/L). Então essas foram incubadas em estufa a temperatura de 35 °C por 72 h (LAZÉRA et al., 1996). Posteriormente, as colônias marrons em ágar níger (Figura 2) foram semeadas no ágar Canavanina Glicina Azul de Bromotimol (CGB) para diferenciação dos complexos (KWON CHUNG et al., 1982).

Figura 2



Ágar níger demonstrando o método de diferenciação fenotípica do *Cryptococcus* spp. (segundo, terceiro e quarto quadrantes) de outras levedura (primeiro quadrante)

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente aos antifúngicos azóis: fluconazol FLC, itraconazol ITC adquiridos da Sigma Aldrich (EUA) e voriconazol (VRC) da Pfizer (EUA) utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Como controle de qualidade dos testes de susceptibilidade, estes foram realizados em duplicata e foram incluídas cepas de referências de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), cujos valores de CIM são entre 1,0 e 4,0 µg/mL para fluconazol, entre 0,12 e 0,50 µg/mL para Itraconazol e entre 0,03 e 0,25 µg/mL para Voriconazol.

Como o documento M27-A3 (CLSI, 2008) não propôs valores limites de suscetibilidade para

Cryptococcus, considerou-se resistentes as leveduras que apresentaram CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol, CIM ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ para itraconazol, CIM ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ para voriconazol e CIM ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B conforme sugerido por outros pesquisadores (NGYEN; YU, 1998; PEDROSO & CANDIDO, 2006; SOUZA et al., 2010).

Resultados e Discussão

Do total de 27 unidades pesquisadas, 51,85% (14 unidades) foram classificadas como “limpas” pois não apresentavam excrementos de pombos. As outras 13 unidades (48,14%) continham quantidades variáveis de excrementos, resultando em um total de 125 amostras. Após o processamento, cinco amostras foram positivas para Cryptococcus, provenientes de duas UBS de distritos sanitários distintos, porém vizinhos, totalizando uma distancia de sete quilômetros entre eles. Todas as amostras, após os testes fenotípicos, foram identificadas como pertencentes ao complexo *Cryptococcus gattii*.

O isolamento deste fungo não é comum na literatura (FIRACATIVE et al., 2018). Baltazar e Ribeiro (2008) relataram uma positividade de 1,2% para *C. gattii* de amostras coletadas de troncos de árvores no estado do Espírito Santo. Araújo Junior (2014) obteve uma positividade de 18% de *C. gattii* em amostras de troncos ocios e árvores vivas da cidade de Araçatuba, SP. Estudos com isolamento de *Cryptococcus* de excrementos de aves no estado de Mato Grosso do Sul são ainda mais raros. Filiu et al (2002) isolou *C. neoformans* de aves em cativeiros na cidade de Campo Grande, MS e mais recentemente, Júnior (2019) isolou essa mesma espécie em escolas municipais da mesma região. Em se tratando de unidades que prestam assistência a saúde, Ferreira-Pain et al (2011) isolou *C. neoformans* (mas nenhum *C. gattii*) em 45 excreta de pombos em áreas externas de um hospital terciário.

Os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) frente aos antifúngicos azóis para os *C. gattii* isolados estão descritos na tabela 1. Como pode-se perceber, todas as leveduras isoladas nesse estudo foram sensíveis aos antifúngicos azóis com destaque para o Voriconazol (VRC) que mostrou excelente atividade *in vitro*.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima para *C. gattii* isolados em Unidades de Saúde de Campo Grande –MS frente aos antifúngicos azóis

Amostra	Fluconazol ($\mu\text{g/mL}$)	Itraconazol ($\mu\text{g/mL}$)	Voriconazol ($\mu\text{g/mL}$)
1	3	0,045	0,015
2	2	0,03	0,015
3	4	0,03	0,015
4	1	0,015	0,015
5	2	0,015	0,015

Na presente investigação, 48% das US visitadas continham excretas de pombos. Acredita-se que essa alta taxa de infestação se deva a arquitetura das UBS, com vigas e nichos protegidos do vento e chuva que são locais propícios para ninhos e pouso dessas aves. Houve, também, expressiva negatividade em US nas quais havia forro e telas, mostrando que o controle dessas aves é possível com medidas simples.

A multiplicação destes fungos no ambiente é favorecida pela presença de compostos nitrogenados e lignina os quais são comuns nos excrementos dessas aves (LAZÉRA et al., 1998; XUE et al., 2006). Isso transforma os locais vulneráveis (grande quantidade de excrementos e circulação de pessoas) em reservatórios de disseminação de micoses, como a criptococose. A implicação desses achados é o risco de exposição aos patógenos da criptococose, que é considerada uma doença oportunista relacionada a alguma debilidade no sistema imune (NUNES, et al., 2018).

Estudos desse tipo, de vigilância epidemiológica, devem se tornar frequentes para a proteção da população que frequenta esses locais. Uma conquista para o controle dessas aves foi a publicação da Lei Complementar nº345/19, que proíbe alimentar os pombos na cidade de Campo Grande, em especial nos espaços ou prédios públicos.

Conclusões

Cryptococcus gattii está presente nas Unidades Básicas de Saúde de Campo Grande. Considerando a escassez de dados sobre isolamento ambiental de Cryptococcus no Mato Grosso do Sul, em especial *C. gattii*, pois esta é a primeira descrição no estado, os resultados obtidos devem contribuir com a ecoepidemiologia nacional e internacional sobre o tema.

Ressalta-se, ainda, o potencial patogênico do complexo *C. gattii* para causar a criptococose em pacientes imunocompetentes, haja vista que os usuários das UBS estão procurando atendimento médico.

Os resultados obtidos fornecem embasamento para os gestores das Unidades Básicas de Saúde pleitearem readequações para eliminar os possíveis abrigos dessas aves. Além disso, possibilita a atualização da comunidade acadêmica e médica sobre a epidemiologia desse fungo oportunista.

Referências bibliográficas

FANG, Wei; FA, Zhenzong; LIAO, Wanqing. Epidemiology of Cryptococcus and cryptococcosis in China. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 7-15, 2015.

- KWON-CHUNG, Kyung J. et al. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. **MSphere**, v. 2, n. 1, p. e00357-16, 2017.
- CHAYAKULKEEREE, M.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, n. 4, p. 215-229, 2006.
- PARK, Benjamin J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525-530, 2009.
- KRONSTAD, James W. et al. Expanding fungal pathogenesis: Cryptococcus breaks out of the opportunistic box. **Nature reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193, 2011.
- ARMSTRONG-JAMES, Darius; MEINTJES, Graeme; BROWN, Gordon D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 3, p. 120-127, 2014.
- MORETTI, Maria Luiza et al. Consenso em criptococose-2008. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 5, p. 524-44, 2008.
- CASADEVALL, Arturo; PERFECT, John R. Cryptococcus neoformans. Washington, DC: **ASM press**, 1998.
- LIN, Xiaorong; HEITMAN, Joseph. The biology of the Cryptococcus neoformans species complex. Annu. **Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 69-105, 2006.
- AMARO, M.C.O. Caracterização de isolados clínicos de Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gatti quanto à susceptibilidade a fluconazol. **Dissertação de Mestrado** (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, 2006.
- MORA, Delio José et al. Clinical, epidemiological and outcome features of patients with cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 321-327, 2012.
- FARIA, Renata Osório de et al. Occurrence of Cryptococcus neoformans in pigeon excrement in the city of Pelotas, State of Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 198-200, 2010.
- FILIÚ, Wander Fernando de Oliveira et al. Avian habitats as sources of Cryptococcus neoformans in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 591-595, 2002.
- LINDENBERG, Andrea De Siqueira Campos et al. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 2, p. 75-78, 2008.
- LAZERA, M. S. et al. Natural habitat of Cryptococcus neoformans var. neoformans in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 34, n. 2, p. 127-131, 1996.
- KWON-CHUNG, KYUNG J.; POLACHEK, ITZHACK; BENNETT, JOHN E. Improved diagnostic medium for separation of Cryptococcus neoformans var. neoformans (serotypes A and D) and Cryptococcus neoformans var. gattii (serotypes B and C). **Journal of clinical microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535-537, 1982.
- NGUYEN, M. Hong; CHRISTINE, Y. Yu. In vitro comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and-resistant Cryptococcus neoformans isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 471-472, 1998.
- SOUZA, L. K. H. et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental Cryptococcus neoformans species complex isolates in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 62-67, 2010.
- PEDROSO, Reginaldo dos Santos; FERREIRA, Joseane Cristina; CANDIDO, Regina Celia. In vitro susceptibility to antifungal agents of environmental Cryptococcus spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 239-243, 2006.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard. 3. Ed. Wayne: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008 (CLSI document M27-A3).
- FIRACATIVE, Carolina et al. Identification of T helper (Th) 1-and Th2-associated antigens of Cryptococcus neoformans in a murine model of pulmonary infection. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 2681, 2018.
- BALTAZAR, Ludmila de Matos; RIBEIRO, Mariceli Araújo. First isolation of Cryptococcus gattii from the environment in the State of Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 449-453, 2008.
- ARAÚJO JUNIOR, Erivelto Corrêa de. Cryptococcus: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. 2014.
- XUE, Chaoyang et al. G protein-coupled receptor Gpr4 senses amino acids and activates the cAMP-PKA pathway in Cryptococcus neoformans. **Molecular biology of the cell**, v. 17, n. 2, p. 667-679, 2006.
- NUNES, Joslaine de Oliveira et al. Cryptococcal meningitis epidemiology: 17 years of experience in a State of the Brazilian Pantanal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 485-492, 2018.