Rev. Inst. Med. trop. São Paulo
35 (1): 77-79, janeiro-fevereiro, 1993

CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS VAR. *NEOFORMANS* ISOLADO DO SOLO

Clenise Canello MACHADO (1), Aline Almeida AMARAL (2) & Luiz Carlos SEVERO (3)

RESUMO

Na tentativa de identificar a possível fonte de infecção, inquiriu-se, na história epidemiológica de 42 pacientes portadores de criptococose, o contato com pombos.

Informações compatíveis com nicho ecológico do **Cryptococcus neoformans** foram positivas em 16. Foram colhidas 59 amostras de solo contendo fezes de pombos, penas e material orgânico.

O **C. neoformans** foi detectado em 4. Uma das amostras era originada da capital e três do interior do estado. O sorotipo A do **C. neoformans** isolado de um liquor coincidiu com o sorotipo da amostra isolada do centro de Porto Alegre, local apontado pelo paciente como possível fonte de infecção, caracterizando caso de **Cryptococcus neoformans** var. **neoformans.**

UNITERMOS: Criptococose; **Cryptococcus neoformans;** Isolamento do solo.

INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans, agente da criptococose, possui vida saprófita na natureza. EMMONS, em 1951, isolou pela primeira vez no solo e, posteriormente, mostrou haver uma estreita relação entre isolamento do solo e ninhos de pombos[3,4].

Demonstrou também que as fezes dessas aves eram um excelente meio de cultivo para **C. neoformans**[5].

Existem quatro sorotipos do fungo, caracterizando duas variedades: **C. neoformans** var. **neoformans** (sorotipos A, D) e **C. neoformans** var. **gattii** (sorotipos B e C).

Atualmente sabe-se que o primeiro está relacionado com solo rico em fezes de pombos e a variedade **gattii** tem sido identificada junto a eucaliptos da espécie **Eucalyptus camaldulensis**[2].

No Brasil, o fungo já foi isolado na Bahia[12,13], São Paulo[8,9], Pernambuco[8], Minas Gerais[9] e Rio de Janeiro[7,9]. Nesta cidade, foi isolada de fezes de morcego procedente de uma casa abandonada, uma cepa correspondente a variedade **gattii**[7]. Em virtude da falta de dados ecológicos o intuito do trabalho é pesquisar fontes saprofíticas do **C. neoformans** no Rio Grande do Sul.

Apresentaremos o primeiro relato sobre associação deste fungo com ninhos de pombos em nosso estado.

MATERIAL E MÉTODOS

No período 1980-1992, foram diagnosticados 91 casos de criptococose nos serviços de micologia do Instituto de Pesquisas Biológicas (SSMA) e Pavilhão Pereira Filho, Santa Casa Porto Alegre, RS. Destes pacientes, 42 foram consultados em relação a uma possível fonte de infecção, sendo que dezesseis responderam afirmativamente. Dos locais indicados pelos pacientes foram colhidas amostras de solo, fezes secas de pombos e outras aves e material orgânico (folhas,penas).

Cerca de 30g do material foram acondicionados em placas de Petri esterilizadas e mantidas, a temperatura ambiente por uma semana após o que foram processadas pelo método de STAIB modificado[1,11]. De cada amostra foram colocadas 10g de material em provetas e adicionadas de 30ml de solução fisiológica esterelizada. Após agitação por 2

(1) Bolsista do CNPq
(2) Bióloga, Institituto de Pesquisas Biologicas, SSMA, RS.
(3) Pesquisador 1C do CNPq; Prof. Adjunto, FAMED/UFRGS;
Endereço para correspondência: *Dr. Luiz Carlos Severo, Instituto Especializado em Pesquisa e Diagnóstico, IPD- Santa Casa, Annes Dias, 285, Porto Alegre RS CEP 90.020-090*

minutos, a suspensão foi deixada em repouso por 10 minutos. Oito mililitros de sobrenadante foram colocados em tubos com tampa e adicionados de 2ml de uma solução de água destilada contendo 4,5mg/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina. Após homogeinização 4 gotas de suspensão foram semeadas em cinco Placas de Petri contendo ágar niger e cinco placas de Petri contendo meio com ácido cafeico[6].

Os cultivos foram incubados a 37°C e observados diariamente.

As colônias sugestivas foram repicadas em tubos com meio inclinado contendo uréia[10] e ácido cafeico[6], e a identificação foi baseada na hidrólise da ureia e na produção de fenoloxidase. Esta conferindo cor escura as colônias, devido a produção de pigmento tipo melanina.

Teste de patogenicidade

De cada cepa de **Cryptococcus neoformans** isolada, foi feita uma suspensão em soro fisiológico estéril com opacidade correspondente a escala número 4 de Mc Farland; 0,02ml dessa suspensão foram inoculados por via intracerebral em camundongos; os animais foram sacrificados no prazo máximo de trinta dias. Fragmentos do cérebro, pulmão, fígado, baço, rins foram submetidos a exame microscópico e cultivados em ágar Sabouraud-dextrose.

RESULTADOS

Dos 16 sítios indicados pelos pacientes (Tabela 1) foram examinadas 59 amostras. De cinco amostras, quatro do interior do estado e uma da capital, provenientes de solos contaminados com fezes de pombos, foram obtidos cultivos de **C. neoformans**. O teste de patogenicidade foi positivo nas cinco cepas. A amostra da capital foi identificada pelo Dr. JOHN E. BENNETT (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), através do meio canavanina-glicina-azul de bromotinol (C.G.B.) e de teste de aglutinação específico, como pertencente ao sorotipo A.

DISCUSSÃO

A falta de dados sobre a ecologia do fungo, no Rio Grande do Sul, apontou a necessidade deste trabalho. A história epidemiológica, relacionada ao manuseio de locais habitados por pombos, foi inquirida dos pacientes, na tentativa de identificar fontes de infecção pelo **C. neoformans**. Como regra esta informação é vaga. Os pacientes não têm idéia clara do local ou momento em que foram contaminados pelo fungo. Uma das exceções foi verificada no centro de Porto Alegre onde a sorotipagem do fungo isolado do líquor de um dos pacientes (sorotipo A) coincide com o sorotipo do fungo isolado da Galeria XV de Novembro, prédio inacabado, onde encontrou-se acúmulo de fezes de pássaros e pombos mortos.

A história do paciente identifica este local como a possível fonte de contaminação.

O conhecimento dos nichos ecológicos de cepas virulentas do **Cryptococcus neoformans** deve ser estimulado. Isto possibilitará a tomada de medidas preventivas, em especial para pacientes imunodeprimidos. A revelação do habitat da variedade **gattii**[2] desencadeou trabalho de pesquisa por nossa equipe,

Tabela 1
Cryptococcus neoformans isolados do solo

Porto Alegre	Amostras no./pos.	Interior (RS)	Amostras no./pos
Museu de Artes	3/0	Sapucaia do Sul	1/0
Parque Redenção	5/0	Canoas	4/0
Hospital Santa Rita	5/0	Santa Maria	2/0
Galeria XV Novembro	4/1	Bento Gonçalves	4/2
Travessa São Domingos	3/0	Viamão	6/0
Sarandi	4/0	Itatiba	4/1
Bioterio, IPB-SSMA	4/0	Venancio Aires	4/0
Av. Princesa Isabel	2/0	Arvorezinha	4/1

no= número de amostras; pos= isolamento positivo
RS= Rio Grande do Sul

por sabermos que o **Eucalyptus camaldulensis,** relacionada com esta variedade do fungo, além de autóctone foi importada da Austrália.

SUMMARY

Cryptococcus neoformans var. *neoformans* isolated from soil.

We inquiry, in the epidemiologic history of 42 patients with cryptococcosis, the contact with pigeon, trying to find the possible source of infection. Of these patients, the information compatible with ecologic niche of **Cryptococcus neoformans** was positive in 16. Fifty nine samples were recovered from soil, associated with pigeon habitat. We found **C. neoformans** in four occasions, one in the capital and three in the interior of state. **C. neoformans**, serotype A, recovered from a central spine fluid coincides with the serotype of the fungus recovered dowtown Porto Alegre, in a place suggested by the patient as possible source of infection, characterizing of a case of **Cryptococcus neoformans.** var. **neoformans.**

AGRADECIMENTOS

Somos gratos aos Drs. JOHN E. BENNETT (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) pela sorotipagem e ao ALBERTO THOMAZ LONDERO (UFSM, Santa Maria, RS) pelas sugestões e correções dos originais; ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica para a autora (Proc. no. 804782-86.5/MP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CIVILA, E. & CONTI-DIAZ, I.A. - Aislamiento de **Cryptococcus neoformans** de excretas secas de palomas en la ciudad de Montevideo. **Pat. clin. Microbiol.,** 3:41-48, 1976.
2. ELLIS, D.H. & PFEIFFER, T.J. - Natural habitat of **Cryptococcus neoformans** var. **gattii. J. clin. Microbiol., 28:** 1642-1644, 1990.
3. EMMONS, C.E- Isolation of **Cryptococcus neoformans** from soil. **J. Bact.,** 62: 685-690, 1951.
4. EMMONS, C.E- Saprophytic sources of **Cryptococcus neoformans** associated with the pigeon **(Columba livia). Amer. J. Hyg., 62:** 227-232, 1955.
5. EMMONS, C.E- Prevalence of **Cryptococcus neoformans** in pigeon habitats. **Publ. Hlth. Rep. (Wash.),** 75: 362-364, 1961.
6. HOPFER, R.L. & BLANK, F. - Caffeic acid-containinng medium for identification of **Cryptococcus neoformans. J. clin. Microbiol., 2:** 115-120, 1975.
7. LAZERA, M.S.- **Fontes saprofíticas de Cryptococcus neoformans na cidade do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 1989. (Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Rio de Janeiro).
8. MELO, N.T.; NIGRO, R.C.; PEREIRA, A.M.; HUGGINS, D.W. & LACAZ, C. da S. - Isolamento de **Cryptococcus neoformans** de fezes de pombos, do solo e ninhos de pombos. **Rev. bras. Med., 44:** 19-23, 1987.
9. ROGERS, A.L. & BENEKE, E.S. - Human pathogenic fungi recovered from Brazilian soil. **Mycopathologia, (Den Haag), 22:** 15-20, 1964.
10. SEELIGER, H.P.E. - Use of urease test for the screening and identification of cryptococci. **J. Bact., 72:** 127-131, 1956.
11. SHIELDS, A.B. & AJELLO, L. - Medium for selective isolation of **Cryptococcus neoformans. Science, 151:** 208-209, 1966.
12. SILVA, M.E. - Ocorrência de **Cryptococcus neoformans** e **Microsporum gypseum** em solos da Bahia. **Bol. Fund. G. Moniz, 17:** 1-14, 1960.
13. SILVA, M.E. & PAULA, L.A. - Isolamento de **Cryptococcus neoformans** de excremento e ninhos de pombos **(Columba Livia)** em Salvador, Bahia (Brasil). **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 5:** 9-11, 1963.

Recebido para publicação em 31/7/1992
Aceito para publicação em 19/10/1992