



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

JULIO CEZAR MARSILIO

JEANNIE YOKOYAMA DE SOUSA

Prevalência de *Cryptococcus neoformans* e *gattii* em fontes ambientais da comunidade em Brasília, Distrito Federal

BRASÍLIA

2019



JULIO CEZAR MARSILIO
JEANNIE YOKOYAMA DE SOUSA

Prevalência de *Cryptococcus neoformans* e *gattii* em fontes ambientais da comunidade em Brasília, Distrito Federal

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica, apresentado a Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Profa. MSc. Fabíola Fernandes dos Santos Castro.

BRASÍLIA

2019

Prevalência de *Cryptococcus neoformans* e *gattii* em fontes ambientais da comunidade em Brasília, Distrito Federal

Julio Cezar Marsilio – UniCEUB, PIC voluntário

julio.marsilio@sempreceub.com

Jeannie Yokoyama de Sousa – UniCEUB, PIC voluntário

jeannie.yokoyama@sempreceub.com

Fabiola Fernandes dos Santos Castro – UniCEUB, professor orientador

fabiola.castro@ceub.edu.br

RESUMO

A criptococose, doença causada pelo fungo do gênero *Cryptococcus spp.*, é uma patologia característica de grandes cidades e conglomerados urbanos, onde exista a possibilidade da proliferação de pombos domésticos. É uma doença importante, pois pode causar uma extensa gama de infecções, desde uma dermatite local, até uma fungemia ou meningoencefalite, forma mais letal da doença. Os pombos, principais vetores da doença, evacuam as leveduras encapsuladas, que, extremamente resistentes, principalmente devido a produção de melanina, podem sobreviver durante anos em ambientes propícios. A pesquisa teve como intuito principal, testar amostras encontradas no perímetro urbano do Plano Piloto em Brasília - DF, a fim de obter resultados epidemiológicos sobre a doença. Para isso, as fezes foram coletadas e levadas para o laboratório de Microbiologia do UniCEUB, onde passaram por um processo identificação. As amostras crescidas em ágar Sabouraud passaram por processo de microscopia com nanquim, onde, qualquer amostra que obtivesse a visualização de leveduras encapsuladas passaria pelo processo de isolamento. Das 20 amostras coletadas (100%), a microscopia foi positiva para 7 (35%). Todas as amostras com microscopia positiva passaram pelo processo de isolamento em ágar, onde apenas 3 (15%) obtiveram crescimento ideal, sem contaminantes ou competição entre microrganismos. Posteriormente, as 3 amostras isoladas foram submetidas a técnica MALDI-TOF, que consiste em uma aplicação de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser. A identificação revelou que das 3 (100%) amostras, 2 (66,6%) foram identificadas como *Cryptococcus albidus* e 1 (33,3%) como *Rhodotorula mucilaginosa*, ambos patógenos emergentes tanto em ambientes cosmopolitas com presença de pombos domésticos, quanto em pacientes imunocomprometidos, como portadores de AIDS, pacientes transplantados ou em pacientes oncológicos.

Palavras-chave: ***Cryptococcus spp.* Comunidade. Fezes de pombo. Criptococose.**

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 6 |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 8 |
| a. Histórico..... | 8 |
| b. Criptococose | 8 |
| c. Identificação morfológica e microscópica | 8 |
| d. Identificação molecular | 9 |
| 3. METODOLOGIA..... | 11 |
| a. Preparo dos meios de cultura Níger e CGB..... | 11 |
| i. Ágar Níger..... | 11 |
| ii. Ágar CGB | 12 |
| b. Seleção, coleta e acondicionamento de amostras..... | 12 |
| c. Processamento das amostras..... | 13 |
| d. Inóculo da amostra em ágar Sabouraud | 13 |
| e. Exame direto de colônias sugestivas | 13 |
| f. Isolamento de colônias sugestivas | 14 |
| g. Repique das colônias semi-isoladas em ágar Níger | 14 |
| h. Inóculo das amostras, isoladas em Níger, em Ágar Sabouraud para MALDI-TOF..... | 14 |
| i. MALDI-TOF | 14 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 15 |
| a. Produção do Ágar Níger: | 15 |
| b. Produção de ágar CGB:..... | 15 |
| c. Crescimento em Ágar Sabouraud: | 16 |
| d. Isolamento de cepas em Ágar Sabouraud..... | 16 |
| e. Inóculo das colônias suspeitas do Ágar Sabouraud em Ágar Níger | 17 |
| f. Identificação por MALDI-TOF..... | 18 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 23 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 24 |

1. INTRODUÇÃO

A criptococose, também conhecida como blastomicose europeia ou doença de Busse-Buschke é uma doença infecciosa, que pode evoluir para uma micose sistêmica que tem como principal consequência a meningoencefalite grave, podendo estar acompanhada de comprometimento pulmonar, fungemia e focos secundários na pele, ossos, rins, e outros tecidos. A transmissão pode ocorrer por meio da inalação de leveduras desidratadas ou basidiósporos. Os sintomas mais perceptíveis e prevalentes da meningite por *Cryptococcus spp.* são dores constantes na nuca, febre de longa duração, muita sudorese, dor atrás dos olhos, perda ponderal, náuseas e vômitos, sendo eles de maior intensidade em pacientes imunocomprometidos. (BRASIL, 2012; CONSENSO, 2008; MORAES; VITAL, 2013).

A criptococose é causada pelo fungo oportunista *Cryptococcus spp.*, pertencente à classe *Blastomycetes*, capaz de afetar tanto seres humanos quanto animais como cães, gatos e cavalos. O *Cryptococcus spp.*, é definido como uma levedura de formato esférico e tamanho irregular, rodeada ou não por uma cápsula de polissacarídeos, possuindo um ou mais brotamentos conectados (PROCOP et al., 2018; QUEIROZ et al., 2008).

Outras espécies de *Cryptococcus*, sendo elas não *neoformans* e não *gattii*, também são encontradas no meio ambiente, tais como *C. laurentii*, *C. curvatus* e *C. albidus*, porém, apesar de possuírem grande adaptação ao meio ambiente, dificilmente sobrevivem em tecidos de mamíferos e, por isso, são raramente associados a infecções em humanos (LEAL, 2006).

O fungo, bem adaptado a regiões cosmopolitas, é frequentemente associado a habitats de aves, como ao da *Columba livia*, o pombo-doméstico, em grandes cidades. Há relatos de colônias de *Cryptococcus spp.* encontradas em árvores nativas ou introduzidas na flora, como eucaliptos e até algumas árvores coníferas, em troncos e caules de árvores apodrecidas, além de ser encontrado em excretas secas de pombos, galinhas, perus e outras aves de pequeno e médio porte (KWON-CHUNG et al., 2014; MAK, VÉLEZ, CASTAÑEDA, 2015; CONSENSO, 2008; e PERFECT, 2015).

O diagnóstico da criptococose é feito por meio do exame direto com coloração de tinta da china, da cultura do microrganismo em meios apropriados, exame citológico e histopatológico ou por meio de técnicas moleculares (CANAVARI et al., 2017).

O meio utilizado para a cultura do microrganismo é o ágar Niger, feito com sementes de *Guizotia abyssinica* e antimicrobianos, como o cloranfenicol, tornando o meio seletivo. O extrato da semente permite que a colônia do *Cryptococcus spp.*, principalmente o *Cryptococcus neoformans*, produza melanina através da função da fenoloxidase, um critério taxonômico importante. A levedura pode crescer em meio Sabouraud glicose, apresentando

colônia de cor branca ou creme, com textura mucóide e brilhante de incubação, em temperatura de 25° a 37°C. O meio CGB (Canavanina-glicina-azul de bromotimol) é utilizado com a finalidade de diferenciar as espécies *gattii* e *neoformans* (PEDROSO, 2007. SIDRIM; ROCHA, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência de possíveis focos de contaminação por *C. neoformans* e *C. gattii* em locais públicos específicos da cidade de Brasília. Foram analisados locais onde o tráfego de pessoas fosse alto, pois não existem estudos sobre ele na região, que por ser uma cidade cosmopolita em expansão, possui diversos focos de pombos domésticos, os quais podem eliminar grandes quantidades de *Cryptococcus spp* nas fezes.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

a. Histórico

O primeiro isolamento e identificação de *C. neoformans* ocorreu no ano de 1894, na Alemanha, por meio do patologista Busse e do clínico Buschke, onde foi observada a presença de microrganismos arredondados. Após o cultivo da lesão óssea, o agente foi identificado como um blastomiceto. Em 1895 foi proposta a mudança para *Saccharomyces hominis*. Em 1901, Vuillemin demonstrou que o termo era inadequado, pois não havia formação de ascósporos e nem de fermentação, fatores que seriam decisivos para a interpretação do microrganismo como tal, transferindo-o para o gênero *Cryptococcus*, preestabelecido em 1833 por Kurtzing. Benham, 1935, analisou morfológica e patogenicamente a forma como o microrganismo reagia em frente a fatores séricos, nos identificados como *Saccharomyces*, *Cryptococcus* e *Torula*, e foi proposta a classificação de *Cryptococcus neoformans* e a micose denominada criptococose (SIDRIM; ROCHA, 2004).

b. Criptococose

Por se tratar de uma infecção oportunista, a criptococose possui caráter cosmopolita, acometendo indivíduos com condições de risco, principalmente pela AIDS, linfomas, leucemias e uso de corticoides. Sendo as regiões Sul e Sudeste do Brasil, as regiões mais predominantes com casos de criptococose associada a AIDS, onde a letalidade pode chegar a 40%. Entretanto, nas regiões Norte e Nordeste há predomínio de criptococose em indivíduos hígidos, em ambos os sexos, causados pelo *C. gattii*. Apresentando assim, um caráter regional (BRASIL, 2012).

Ambas são capazes de causar meningoencefalite, podendo estar acompanhada de lesões pulmonares, fungemia e focos secundários, acometendo pele, ossos, etc. A mortalidade varia dependendo do país, podendo chegar de 10% em países desenvolvidos e 43% em países em desenvolvimento (CONSENSO, 2008).

c. Identificação morfológica e microscópica

Os *Cryptococcus* spp. representam a forma assexuada de basidiomicetos. Estes apresentam-se na forma de leveduras globosas, com um ou mais brotamentos e envolvidas por uma cápsula composta por mucopolissacarídeos. Essa cápsula é composta predominantemente de glucuronoxilomanana, fator determinante dos sorotipos de

Cryptococcus spp (Tabela 01). A microscopia é realizada com tinta nanquim (tinta da China) ou 0,1% de branco de calcofluor (microscópio de imunofluorescência). Estas podem ser visualizadas em amostras de líquido, escarro, lavado brônquico, urina, abscesso, fragmentos de tecidos, aspirados de medula óssea e de gânglios. (CONSENSO, 2008).

Quadro 01: Sorotipos existentes dentro do gênero *Cryptococcus* spp grupos neoformans e gattii.

| Serotipo | Gênero e espécie |
|----------|---|
| A | <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> |
| B | <i>C. gattii</i> |
| C | <i>C. gattii</i> |
| D | <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> |
| AD | <i>C. neoformans</i> |

Fonte: MAZIARZ; PERFECT, 2016.

d. Identificação molecular

A identificação através dos padrões moleculares é baseada na técnica MALDI-TOF, do inglês, Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz e analisador de Tempo de Voo (GOULART, RESENDE, 2013).

A técnica MALDI-TOF utiliza princípios físicos e químicos para obter informações dos componentes protéicos da amostra em um espectrômetro de massa, cruzando essas informações obtidas no aparelho com um banco de dados, podendo assim determinar desde o gênero até o genótipo da amostra em questão (CROXATTO, PROD'HOM e GREUB, 2012).

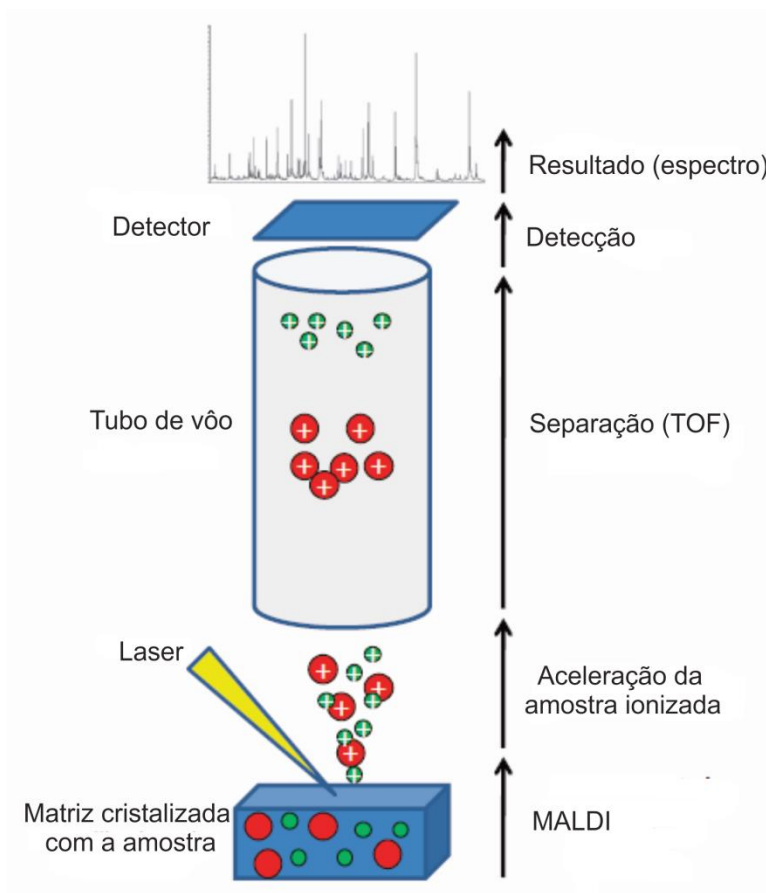
A Espectrometria de Massa por MALDI-TOF funciona da seguinte forma: primeiro, a amostra é disposta em uma placa própria para uso no aparelho juntamente com uma matriz, uma solução saturada de composto orgânico com baixa massa, que será responsável por fornecer prótons H^+ , que em pouco tempo, em temperatura ambiente, seca e cristalizada. Essa matriz será então bombardeada com um laser de nitrogênio de 337 nm, a cerca de 50Hz, e irá absorber toda essa energia e transferi-la para a amostra (CLARK *et al.*, 2013).

A amostra, agora supercarregada com prótons, passa por um processo de dessorção, ou seja, irá realizar o oposto de absorção, sendo liberada de uma superfície, possibilitando a passagem instantânea da matéria em estado sólido para estado gasoso (CROXATTO, PROD'HOM e GREUB, 2012).

Esses componentes em estado gasoso são então direcionados a um tubo de vácuo absoluto onde, através de campos eletromagnéticos, são acelerados e separados por massa em relação a sua carga elétrica (m/z). Os componentes separados chocam-se com um detector, capaz de gerar um espectro, um gráfico capaz de diferenciar as moléculas baseado em sua massa e carga elétrica (CLARK *et al.*, 2013)

Esse processo inteiro acontece em poucos minutos, e pode ser exemplificado pela Figura 1.

Figura 1: Descrição da técnica de MALDI-TOF.



Fonte: GOULART; RESENDE, 2013. Adaptado de: CROXATOO; PROD'HOM; GREUB, 2012.

3. METODOLOGIA

Para a realização dos objetivos estipulados para a pesquisa, o estudo experimental foi selecionado, sendo capaz de mesclar as atividades de bancada na área de micologia e a saída de campo para coleta das amostras.

O plano de trabalho elaborado foi dividido entre as partes teórica e prática, tendo início por um estudo mais intenso sobre a patogenicidade e difusão do microrganismo no ambiente, preparo dos meios de cultura, coleta de amostras, preparo das amostras, visualização microscópica, semeio em meios de cultura apropriados, MALDI-TOF, análise e interpretação dos resultados e divulgação dos resultados na pesquisa.

a. Preparo dos meios de cultura Níger e CGB

Antecipadamente, durante fase inicial da pesquisa, em consenso, foi decidido que os pesquisadores seriam responsáveis pela preparação dos meios de cultura, a fim de angariar tempo para a coleta e processamento das amostras e diminuir os custos da pesquisa, visando poupar o recurso financeiro para a realização da técnica MALDI-TOF.

i. Ágar Níger

Utilizando da receita encontrada na literatura de xxx(XX), a produção do ágar teve início com o recebimento dos materiais no final de março/19.

Para obter o ágar níger de primeira produção: foram moídas 14 gramas das sementes com um pilão de cerâmica. Após moídas, estas foram fervidas e deionizadas em 300 mL de água por 15 minutos em banho-maria a 100°C. A solução foi filtrada e completou-se com água deionizada até alcançar 300 mL, para então solubilizar 2 gramas de glicose, 4 gramas de ágar bacteriológico e 0,2 gramas de creatinina. A solução então totalmente sem resquícios físicos foi filtrada e levada à autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Com a solução autoclavada e resfriando, foi então adicionado 10 miligramas de cloranfenicol e então, despejados 10 mL da solução em tubos para meio de cultivo com tampa rosqueada.

Para a segunda produção de ágar Níger, os pesquisadores fizeram pequenas modificações, aumentando a quantidade de sementes a serem moídas para 30 gramas, bem como o aumento do tempo de fervura das sementes para 30 minutos, foi adicionada a etapa de filtração das sementes com água fervente, logo após a fervura e, ao invés de realizar a autoclave com a solução total em erlenmeyer, a mesma foi fracionada em tubos para meio

de cultivo com tampa rosqueada, onde cada tubo continha pelo menos 10 mL do meio, para assim serem levados ao autoclave.

ii. **Ágar CGB**

Seguindo a receita proposta por Kwon-Chung (1981), os ingredientes para o preparo do meio foram adquiridos pelo UniCEUB e entregue aos pesquisadores no final de março/19.

O preparo seguiu, em sua maioria, todas as instruções, pequenas modificações foram necessárias para se encaixar nos materiais, nos equipamentos e na janela de tempo disponível, sendo estas o preparo de duas soluções distintas:

Solução A:

- 10 gramas de glicina;
- 1 grama de fosfato monopotássico;
- 1 miligrama de hidrocloreto de Tiamina;
- 30 miligramas de sulfato de L-Canavanina;
- 100 mililitros de água destilada.

Solução B:

- 400 miligramas de Azul de Bromotimol;
- 64 mililitros de solução de NaOH a 0,01 N;
- 36 mililitros de água destilada.

Para o preparo de um litro de meio, foram usados 880 mililitros de água destilada, 100 mililitros da solução A, 20 mililitros da solução B e 20 gramas de ágar. A solução final foi então autoclavada durante 20 minutos e então, quando perto dos 48°C, foi disposto em tubos de vidro estéreis com tampa. Os tubos foram colocados para resfriar a temperatura ambiente em uma inclinação de aproximadamente 45°, quando quase sólidos, os tubos foram tampados e guardados para uso.

b. Seleção, coleta e acondicionamento de amostras.

As amostras foram selecionadas levando em conta dados como o tráfego de pessoas nas zonas planejadas. Foi realizada a coleta de amostras de fezes secas encontradas em pontos distintos, com pelo menos 0,5g foram coletadas com auxílio de espátulas de metal estéreis e descartáveis. As amostras foram reservadas em potes de coleta universal estéreis,

e transportadas até o laboratório de microbiologia do UniCEUB. No laboratório, as amostras permaneceram acondicionadas nos potes em temperatura ambiente, numeradas e identificadas, por um período menor que uma semana para o processamento das mesmas.

c. Processamento das amostras

Para o preparo das amostras, as mesmas foram levadas à capela de fluxo laminar, a fim de evitar sua contaminação e de levar os pesquisadores a exposição ao fungo, tendo em vista a forma de transmissão da doença. As amostras foram então maceradas utilizando um gral e um pistilo de cerâmica, ambos esterilizados, onde os valores de 0,5g até um limite de 2g foram suspensos em 10mL de uma solução preparada à base de cloreto de sódio 0,9% estéril com cloranfenicol (0,2g/L) em tubos falcon.

A mistura foi levada ao vórtex durante 3 minutos, para homogeneização completa e posteriormente, deixada em repouso durante 30 minutos.

d. Inóculo da amostra em ágar Sabouraud

Após o repouso, 100 microlitros do sobrenadante de cada amostra foram inoculadas em ágar Sabouraud, respectivamente identificados. Os ágares foram armazenados a distância de contaminantes, em temperatura ambiente por um período que compreendeu de 48 horas a 7 dias, com observação diária.

Todas as amostras e colônias suspeitas (com aparência mucóide, leve brilho sob a luz, lisas, com coloração variando do branco/creme até um leve tom de marrom) passaram pelo processo de microscopia com nanquim.

e. Exame direto de colônias sugestivas

Colônias sugestivas (com aparência mucóide, leve brilho sob a luz, lisas, com coloração variando do branco/creme até um leve tom de marrom) crescidas no ágar Sabouraud foram submetidas a visualização óptica em microscópio. Fez-se um esfregaço de todas as amostras, todas identificadas com os respectivos números, com auxílio de uma alça bacteriológica de 1 microlitro, e 10 a 15 microlitros de nanquim estéril (tinta da china).

Uma lamínula foi posta em cima da suspensão e a microscopia foi realizada em objetiva de 40x. A observação de leveduras com halos transparentes ao seu redor foi o achado para distinguir as amostras positivas das negativas.

f. Isolamento de colônias sugestivas

As colônias sugestivas passaram então, por um segundo processo de isolamento físico, através do repique constante das colônias que se apresentavam com aspecto puro e sem contaminantes em ágar Sabouraud.

A cada repique, foi realizado outra microscopia com nanquim, a fim de averiguar se a amostra possuía elementos contaminantes, como outras leveduras ou bactérias, no âmbito de obter uma colônia puramente composta por *Cryptococcus spp.*

g. Repique das colônias semi-isoladas em ágar Níger

Em seguida, as colônias semi-isoladas crescidas em ágar Sabouraud foram repicadas em ágar Níger, seletivo e específico para o crescimento e identificação de *Cryptococcus spp.*.

Os repiques foram deixados por um período de 24 a 72 horas em ambiente fresco, sem correntes de ar, isolados de luz e outros possíveis contaminantes, em temperatura ambiente.

Onde houve crescimento de colônias com cores escuras, de castanho a marrom escuro, foi possível confirmar o gênero *Cryptococcus spp.*

h. Inóculo das amostras, isoladas em Níger, em Ágar Sabouraud para MALDI-TOF

Por último, as colônias crescidas em ágar níger, mesmo não produzindo a melanina, foram selecionadas e repicadas em Ágar Sabouraud.

As amostras isoladas foram então submetidas a técnica MALDI-TOF, juntamente com a cepa controle positivo, cedida pelo orientador.

i. MALDI-TOF

Por último, com as espécies de todas as amostras positivas identificadas e isoladas, foi possível submetê-las ao processo de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz com detecção por tempo de voo (do inglês, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry).

Por meio da ionização das macromoléculas biológicas, e um complexo sistema de dessorção e aceleração em campo elétrico no vácuo, o aparelho é capaz de gerar um espectro de massa, que, com auxílio de um software de processamento e um banco de dados, é capaz de diferenciar e identificar, a nível molecular, a cepa e o genótipo de cada amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram coletadas na ordem e nas localidades apresentadas no quadro 1, num período que compreendeu da primeira semana de junho até a segunda semana de agosto.

a. Produção do Ágar Níger:

Os ingredientes referentes à confecção do ágar Níger foram recebidos em março/2019. Os ágares da primeira produção foram testados com a cepa controle positivo, *Cryptococcus neoformans*, fornecido pelo orientador. Após inóculo em um ágar Sabouraud, para grupo controle, e em um Níger produzido pelos pesquisadores, observou-se a ausência de crescimento no Níger. O teste foi repetido outras duas vezes, mas todas obtiveram os mesmos resultados. Por consequência, os pesquisadores levantaram a hipótese do meio não possuir a quantidade necessária de nutrientes, como a creatinina, então, em proporção inversamente proporcional, a quantidade dos materiais a serem solubilizados aumentou em relação à água destilada utilizada como solvente.

O ágar da segunda produção foi testado, com um grupo controle de ágar Sabouraud, mas novamente não obteve crescimento nenhum. O teste de crescimento foi repetido duas vezes, apresentando apenas crescimento do ágar Sabouraud, por orientação, os ágares níger foram descartados.

b. Produção de ágar CGB:

Os ingredientes para o ágar CGB foram recebidos em abril/2019. O preparo foi realizado em 3 diferentes práticas. Das 3 produções, duas obtiveram resultados satisfatórios, do ponto de vista macroscópico, com uma das produções sendo descartada pela não solidificação do meio.

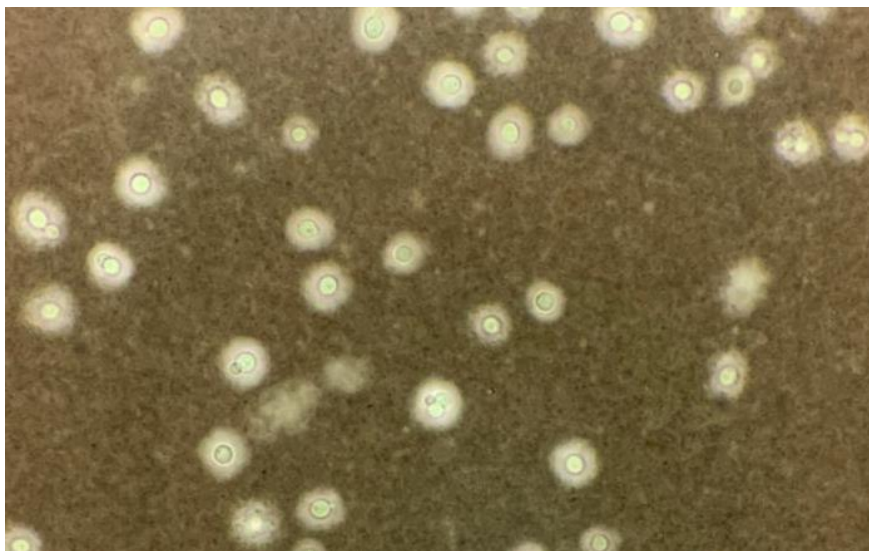
Os ágares foram então acondicionados em lugar isolado, fora de correntes de ar, mantidos em temperatura ambiente, durante um período menor que uma semana. Nos decorrerres da semana, foi necessário descartar uma das produções do meio, pois foram encontradas contaminações, interferindo no interesse e finalidade da pesquisa.

A terceira e última produção do meio, foi descartada pelos pesquisadores, em consenso com o orientador, devido a falta de uma cepa controle positiva de *C. gattii*, para concluir se o meio estava apto a realizar essa diferenciação ou não, a fim de eliminar as chances de obter um resultado falso, tanto negativo quanto positivo, durante a identificação das amostras.

c. Crescimento em Ágar Sabouraud:

Todas as colônias com aparência mucóide, leve brilho, lisas, com coloração variando do branco ou creme, até um leve tom de marrom passaram pelo processo de microscopia com nanquim, onde 35% (7/20) apresentaram observação de leveduras encapsuladas, bem como a presença de outras bactérias e leveduras.

Figura 2: Foto da amostra 1 em microscopia 40x com tinta nanquim



Fonte: MARSILIO, YOKOYAMA, 2019

d. Isolamento de cepas em Ágar Sabouraud

Sem os meios próprios para o isolamento das amostras, em consenso, os pesquisadores, juntamente do orientador, decidiram tomar a abordagem de isolar manualmente, selecionando a colônia suspeita e inoculando-a em outro ágar Sabouraud, na tentativa de, a cada repique, diminuir a quantidade de contaminantes e permitir que o *Cryptococcus spp.* se desenvolvesse sem competição com outros microrganismos encontrados tanto nas fezes dos pombos, quanto no solo.

Dentre as 7 amostras positivas no teste do nanquim, apenas 3 (43% das amostras positivas, 15% do total de amostras) possuíam colônias que correspondiam com a definição de colônias características. As outras 4 amostras positivas no nanquim e sem colônias características (57% das amostras positivas, 20% do total de amostras) passaram novamente

por todo o processo de isolamento e identificação, a fim de encontrar e isolar o *Cryptococcus* spp. Após outras duas tentativas, não foi possível isolar a levedura desejada, devido à baixa quantidade do microrganismo, associada à prevalência de outras leveduras e bactérias presentes no meio, e sob orientação, os meios foram descartados.

e. Inóculo das colônias suspeitas do Ágar Sabouraud em Ágar Níger

As 3 amostras positivas com colônias suspeitas foram inoculadas em Ágar Níger, para confirmação da produção de melanina, característica do *Cryptococcus neoformans* e *gattii*., porém nenhuma das colônias apresentou a pigmentação característica, um dos fatores que sugeriu a possibilidade da espécie analisada pertencer ao grupo não-*neoformans* e não-*gattii*.

Utilizando como base o estudo feito por Pedroso *et al.* (2007), de 48 amostras analisadas de quatro espécies diferentes, apenas 46,2% (22 amostras) obtiveram produção de melanina, sendo principalmente as pertencentes a espécie *neoformans*. Das amostras existiam: 16 de *C. neoformans*, 17 de *C. albidus*, 13 de *C. laurentii* e por fim, 2 de *C. uniguttulatus*.

Figura 3: Foto da amostra 11 em ágar Níger, sem pigmentação característica do gênero *Cryptococcus* spp.



Fonte: MARSILIO, YOKOYAMA, 2019

f. Identificação por MALDI-TOF

Com a identificação por MALDI-TOF, obteve-se como resultado, com 99,9% de certeza, *Cryptococcus albidus* nas amostras 1 e 11, *Rhodotorula mucilaginosa* na amostra 4 e *Cryptococcus neoformans* na cepa controle positivo.

A identificação dessas espécies foi reveladora para os pesquisadores e orientador. A hipótese de que a produção de melanina no ágar níger tenha sido negativa devido a espécie de *Cryptococcus* isolada em ágar Sabouraud e Níger, e positivada na microscopia com nanquim, corroboram com as considerações e estatísticas apresentadas por Pedroso *et al.* (2007).

O surgimento do *C. albidus* foi extremamente relevante, pois atualmente, este é classificado como um patógeno emergente dentro do gênero *Cryptococcus*, já que, dentro dos grupos não-neoformans e não-gattii, é o que mais está associado em casos de meningoencefalite (CONSENSO, 2008).

O *C. albidus* é um patógeno que, apesar de menos eficiente para infecção em mamíferos, atinge cada vez mais a população imunocomprometida, com aproximadamente a mesma periculosidade de uma infecção por *C. neoformans* (KURTZMAN *et al.*, 2011).

O *Rhodotorula mucilaginosa* também é descrito como um patógeno oportunista emergente, onde, de toda as doenças causadas por este gênero, mais de 40% estão associadas a quadros de imunossupressão (TUON; COSTA, 2008.).

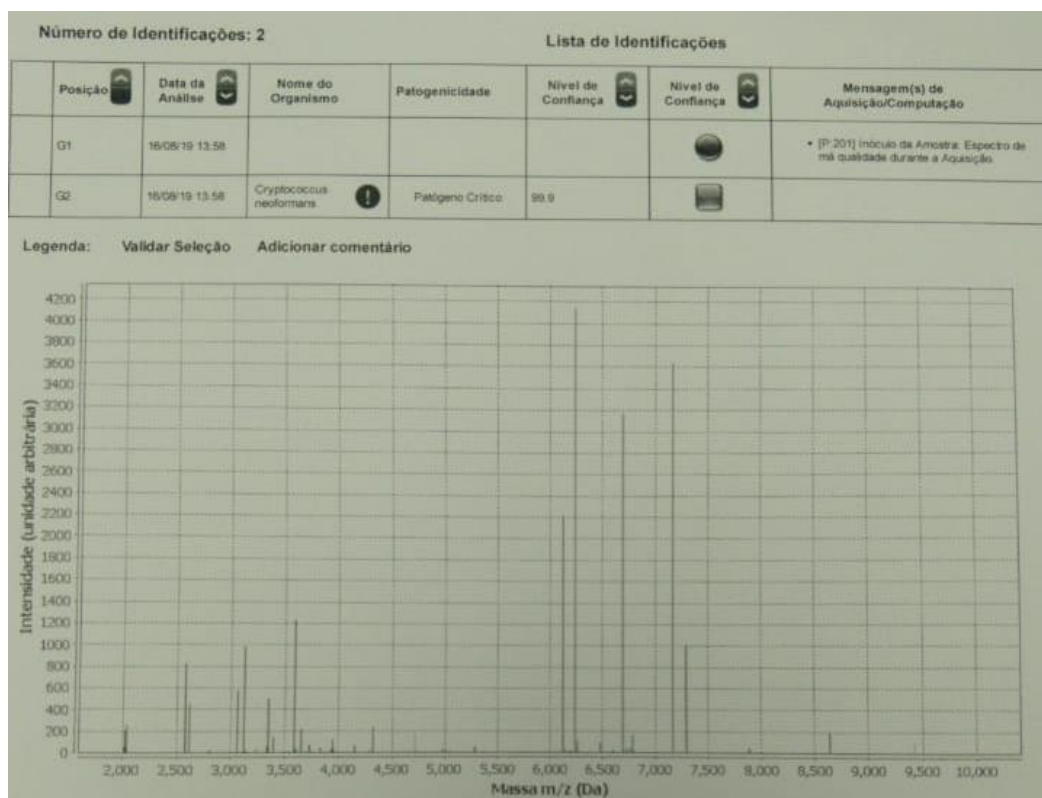
Existem também, casos onde o *R. mucilaginosa* foi identificado em crescimento concomitantemente ao *Cryptococcus spp.* (COLOMBO, 2015), o que explicaria o encontro de leveduras encapsuladas na amostra e a identificação de *Rhodotorula mucilaginosa* no MALDI-TOF.

Figura 4: Padrão de leitura VITEK MS da amostra 1



Fonte: MARSILIO, YOKOYAMA, 2019

Figura 5: Padrão de leitura VITEK MS da cepa de controle positivo



Fonte: MARSILIO, YOKOYAMA, 2019

QUADRO 2: número das amostras, local de coleta, presença de crescimento de colônias características em ágar Sabouraud e microscopia em nanquim.

| Nº. amostra | da | Local de Coleta | Colônia Característica | Nanquim |
|-------------|----|---------------------------------|------------------------|----------|
| 1 | | SCS, Q. 1, Ed. Serra Dourada | Sim | Positivo |
| 2 | | SHLN BI. D | Não | Negativo |
| 3 | | SQN 306, BI. I | Não | Positivo |
| 4 | | Praça dos Três Poderes (Pombal) | Sim | Positivo |
| 5 | | SQN 311, BI. B | Não | Negativo |

| | | | |
|----|---|-----|----------|
| 6 | Corredor do ICC (UnB) Norte | Não | Negativo |
| 7 | SQN 707, BI. J | Não | Negativo |
| 8 | SCLS 105/106 | Não | Negativo |
| 9 | SCLS 107/108, BI. C | Não | Negativo |
| 10 | SCLS 107/108, BI. A/B | Não | Negativo |
| 11 | SCLS 408/409 | Sim | Positivo |
| 12 | SCLS 207, BI. B/C | Não | Positivo |
| 13 | SCLS 205, BI. B/C | Não | Positivo |
| 14 | SCLS 406, BI. B/C | Não | Positivo |
| 15 | SCLN 407, BI. B | Não | Negativo |
| 16 | Parque da Cidade (Parque Ana Lúcia) | Não | Negativo |
| 17 | Torre de TV (Espelho d'Água da Torre) | Não | Negativo |
| 18 | Reitoria da UnB | Não | Negativo |
| 19 | Restaurante Universitário (UnB) | Não | Negativo |
| 20 | Instituto de Letras (UnB) | Não | Negativo |

Fonte: MARSILIO; YOKOYAMA, 2019.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criptococose tem crescido como doença importante no sistema de saúde mundial, com relatórios mundiais apontando mais de 180 mil mortes anuais por infecções de *Cryptococcus spp.*

O controle dessa doença é de extrema importância, pois é de fácil prevenção. O fungo é encontrado em troncos e galhos putrefatos e, principalmente, em fezes de aves de pequeno e médio porte.

O controle dos pombos presentes em uma determinada área urbana também é importante para a saúde, pois, eles são transmissores de diversas outras doenças.

Os resultados obtidos na pesquisa demonstram a facilidade com que patógenos podem crescer e se reproduzir em larga escala em um ambiente metropolitano, afetando aos habitantes que possuem alguma imunodeficiência, portadores de AIDS, transplantados e pacientes quimioterápicos.

Os dados também corroboram para mostrar que não existe mais um nicho específico portando apenas os *Cryptococcus* pertencentes aos grupos *neoformans* e *gattii*, o que demonstra a capacidade de adaptabilidade do gênero como um todo, e sua periculosidade como um patógeno oportunista.

Condizente com a importância da infecção fúngica, é necessário o controle epidemiológico dessa doença, principalmente numa região cosmopolita em expansão ininterrupta como Brasília.

Existe também a necessidade de melhorar as técnicas para identificação do fungo no ambiente, pois estas ainda se mostram pouco efetivas e de relativa baixa sensibilidade.

É importante ressaltar o fato de que, por ter relativa menor importância, muitos casos da doença terminam com uma evolução desnecessária, levando ao óbito do paciente ou então ao tratamento empírico.

O Brasil ainda carece de pesquisas com o âmbito desta, para levantar dados epidemiológicos sobre a doença, seu agente patogênico e seus vetores. É identificada então a oportunidade para evoluir a pesquisa, para obter resultados em uma larga escala, o que não foi possível por conta das limitações materiais para produção dos meios e dos testes utilizados, ainda de difícil acesso no Brasil.

6. REFERÊNCIAS

BRASIL, 2012: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/proposta_ver_criptococose1.pdf> Acesso em: 16 ago. de 2019.

Consenso em criptococose - 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Relatório Técnico, set-out, 2008.

CLARK, A. E.; KALETA, E. J.; ARORA, A.; *et al.* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 547–603, 2013.

COLOMBO, G. *et al.* Caracterização bioquímica e molecular de *Cryptococcus* spp. isolados de excretas ambientais de pombos (*Columba livia domestica*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 6, p. 1639–1645, 2015.

CROXATTO, Antony; PROD'HOM, Guy; GREUB, Gilbert. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 380–407, 2012.

GOULART, Vânia Aparecida Mendes; Resende, Rodrigo R. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer – **O jornal eletrônico do Instituto NANOCELL**, v. 1, n. 3, 21 de novembro de 2013. Disponível em: <<http://www.nanocell.org.br/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/>>. Acesso em: 15 ago. de 2019.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *The yeasts: a taxonomic study*, 5th ed. New York: ACM Press, 2011. p. 1661-1662.

KWON-CHUNG, K J; POLACHECK, I; BENNETT, J 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.

PEDROSO, R. S., *et al.* Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 40(5):566-568, set-out, 2007.

TUON, F.F.; COSTA, S.F. Rhodotorula infection: a systematic review of 128 cases from literature. **Revista Ibero-americana de Micologia**, v.25, p.135-140, 2008.