
Cryptococcus neoformans ISOLADOS DE *Periplaneta americana*
RECOLHIDAS DE AMBIENTES PÚBLICOS
E SUA RELEVÂNCIA PARA SAÚDE HUMANA E ANIMAL

Pablo Waldeck Gonçalves de Souza,¹ Daniel Paiva Barros de Abreu² e Francisco de Assis Baroni³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *Cryptococcus neoformans* em baratas (*Periplaneta americana*) recolhidas de ambientes públicos. A motivação para esta pesquisa deve-se ao fato de esta espécie de barata ser sinantrópica e veiculadora de vários agentes patogênicos para o homem e animais, o que é relevante para a saúde pública. Os insetos foram recolhidos vivos, mediante emprego de armadilhas, e também mortos, totalizando 150 amostras. A pesquisa da presença do agente nos insetos foi feita no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do Instituto de Veterinária da UFRRJ, por processamento do exoesqueleto e de seu conteúdo interno, com semeadura em meio de cultivo contendo dopamina. As confirmações de isolamento foram realizadas por meio de testes de macromorfologia, micromorfologia, auxanograma e provas complementares. Não se obteve o isolamento de *Cryptococcus neoformans* do exoesqueleto; os cinco obtidos (3,3%) foram do conteúdo interno dos insetos que, após sorogrupagem em meio CGB, revelaram-se pertencentes ao sorogrupo AD. As baratas da espécie *Periplaneta americana* são, portanto, consideradas um potencial vetor para a levedura estudada.

DESCRITORES: *Cryptococcus neoformans*. Baratas. Escolas. Hospitais. Igrejas.

1 Secretaria de Saúde, Prefeitura Municipal de Mesquita, Rio de Janeiro, Brasil.

2 Acadêmico, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

3 Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

Endereço para correspondência: baroni@ufrj.br

Recebido para publicação em: 19/4/2011. Revisto em: 24/6/2011. Aceito em: 8/7/2011.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O gênero *Cryptococcus* compreende aproximadamente 75 espécies (3, 9); no entanto, *C. neoformans* e *C. gattii* são as duas espécies consideradas potencialmente patogênicas, por isso vêm apresentando crescente importância nas últimas décadas (7, 8). Outras espécies têm menor relevância clínica, mas devem inspirar preocupação se forem considerados os casos de imunossupressão e o fato de coabitarem o mesmo nicho ecológico (1, 22). Isolamentos das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* e também da espécie *C. laurentii* (considerada emergente) foram realizados a partir de cérebro de cães que apresentavam sintomatologia relacionada à raiva (2).

Leveduras pertencentes a este gênero podem estar distribuídas na natureza, associadas a resíduos orgânicos tanto de animais como de vegetais, sendo principalmente encontradas em excretas de aves, sobretudo de pombos (*Columbia livia*). A elevada prevalência desta ave em ambientes urbanos gera o acúmulo de excretas, que é a principal fonte de infecção para homens e animais. Além do isolamento de resíduos orgânicos de aves, existem relatos de outras fontes como ar, solo, flores, folhas e troncos de algumas árvores e outros materiais arbóreos em decomposição (1, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22).

As baratas vivem nas proximidades de residências, portanto são consideradas insetos blatódeos sinantrópicos e, como tal, podem desempenhar importante papel não só como vetores de doenças, mas também como carreadores e reservatórios de importantes patógenos, fatos estes que determinam sua importância para a saúde pública (17, 19, 23, 33). Por esta razão, *Periplaneta americana* tem sido objeto de vários estudos. Muitas pesquisas realizadas concentram-se na presença de bactérias que estes insetos podem carrear (12), mas uma variedade de fungos de importância médica foi isolada de baratas da espécie *Periplaneta germanica* coletadas de ambientes hospitalares e de áreas residenciais em diferentes estações (4). No que se refere especificamente a hospitais, outros autores isolaram fungos de baratas presentes nestes ambientes (27, 28). No Brasil, um importante estudo isolou *Candida* spp, além de *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Alternaria* spp, entre outros menos frequentes, de 93,2% das baratas recolhidas em hospitais, incluindo unidades de tratamento intensivo (13). Em todos os casos, o isolamento de *Cryptococcus* spp não foi citado. Em relação a *Cryptococcus* spp, a espécie *C. neoformans* foi isolada pela primeira vez do conteúdo digestivo da espécie *Periplaneta americana* no Zaire (30, 31). Um dos fatores que tornam esta espécie importante na disseminação de patógenos é a sua alimentação onívora, pois engloba uma série de materiais, além de sua conhecida atividade coprófaga, o que amplia a possibilidade de ingestão de vários microrganismos. Consequentemente, excretas de pombo que possuam elevada carga destas leveduras podem ser ingeridas, tornando a barata um possível reservatório de *C. neoformans* ou de outras espécies do gênero presentes neste material. As baratas podem ser potenciais vetores de infecções nosocomiais, estando

presentes em 46,7% dos hospitais estudados. A gravidade maior reside no fato de ter sido identificado um percentual de 78,1% desta presença nas áreas clínicas dos hospitais (20).

O objetivo do presente trabalho foi verificar a possível presença de *C. neoformans* no conteúdo interno e no exoesqueleto de baratas recolhidas em ambientes públicos, determinando o índice de isolamento na amostragem e o sorogrupo dos possíveis isolados, dados estes de relevância para a saúde humana e animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se um levantamento da presença ou não de *Cryptococcus* spp em baratas da espécie *Periplaneta americana* recolhidas em ambientes públicos, fazendo a estimativa do percentual de isolamento. O estudo desenvolveu-se no período de maio de 2006 a agosto de 2007, abrangendo todas as estações climáticas. Definiu-se como principais critérios para seleção dos locais de coleta dos insetos que as edificações fossem de livre acesso ao público e que houvesse a presença de fezes de pombos positivas para *Cryptococcus* spp. Portanto, foram escolhidos para a realização de coletas um hospital federal de referência e uma igreja católica, ambos localizados no município do Rio de Janeiro, e dois Centros Integrados de Educação Pública (CIEPs), um localizado também no Rio de Janeiro e outro no município de Seropédica-RJ.

Para a apreensão de baratas vivas, foram empregadas armadilhas e a coleta direta com sacos plásticos. As armadilhas foram preparadas com garrafas do tipo PET contendo ração canina como iscas. As aberturas eram cobertas com fita adesiva transparente, com a parte gomada voltada para o interior da garrafa obstruindo metade da passagem. Este sistema permite a entrada do inseto, mas a sua saída é impedida pela parte gomada da fita. Insetos mortos nos ambientes selecionados que apresentassem seu exoesqueleto intacto também eram recolhidos.

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ (LLPA-UFRRJ). As baratas vivas antes de processadas foram imobilizadas a uma temperatura de 0°C a 5°C por um período de 5 a 20 minutos (24). Após esta etapa, todas as amostras foram levadas para cabine de segurança biológica e colocadas em frascos de Erlenmeyer individuais, estéreis, contendo 50mL de tampão salina (0,9%) acrescidos de cloranfenicol (200mg/litro), permanecendo por dez minutos para que fosse possível obter uma amostra representativa da contaminação micótica do exoesqueleto de cada barata. Passado este tempo, as amostras foram retiradas de seus respectivos frascos, permanecendo estes em repouso durante uma hora para ascensão e flutuação das possíveis células fúngicas. Posteriormente, retirou-se uma alíquota de 0,1mL do sobrenadante dessas amostras que foi semeada em triplicata em meio contendo dopamina.

Para não haver interferência da biota do exoesqueleto com a micobiota interna dos insetos, realizou-se, em seguida, a sua degermação externa mediante

passagem em salina com cloranfenicol, solução de iodo e álcool (um minuto de exposição em cada recipiente), triturando-os a seguir em solução salina (0,9%) com o auxílio de um bastão de vidro estéril e em agitador magnético. Seguiu-se repouso de uma hora, após o qual foi retirada uma alíquota de 0,1mL do sobrenadante das amostras que foi semeada em triplicata em meios de cultura contendo dopamina. Para uma distribuição uniforme nas placas de Petri, foram empregadas alças de Drigalski esterilizadas. As placas foram incubadas em temperaturas de 25°C, 32°C e sob refrigeração.

Partindo das colônias isoladas, inicialmente foram realizados exames macromorfológicos utilizando-se como critério auxiliar a formação de colônias com coloração marrom em meio com dopamina. As colônias compatíveis com o microrganismo esperado eram selecionadas para exame microscópico e aquelas que apresentassem células características do gênero eram suspensas em salina e novamente inoculadas em meio contendo dopamina para obtenção de colônias puras. A identificação foi realizada seguindo-se os critérios preconizados por Kurtzman & Fell (5) e, complementarmente, o protocolo de identificação do LLPA. Estes procedimentos de isolamento e de identificação desta levedura, assim como o processamento dos insetos, são também descritos, com poucas variações, por outros autores (1, 2, 5, 20, 24). Foram consideradas, além das características morfológicas e culturais, as características nutricionais de *C. neoformans* e de *C. gattii*, como assimilação de fontes nitrogenadas e carbonadas, hidrólise de ureia e fermentação negativa.

Concluída a identificação das cepas isoladas, estas foram submetidas à sorogrupagem em meio CGB (Canavanina, Glicina e Azul de bromotimol) (6). Neste meio de cultura, somente *Cryptococcus gattii* é capaz de se desenvolver por não apresentar sensibilidade à canavanina e ser capaz de utilizar glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, diferente do *C. neoformans*. Com alteração do pH, o azul de bromotimol revela-se dando ao meio coloração azul cobalto. Os testes foram realizados em duplicata com incubação a 25°C com leituras diárias até o sétimo dia.

RESULTADOS

De um total de 150 baratas capturadas por meio de armadilhas e por captura direta, resultaram cinco isolados pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, todos caracterizados como *C. neoformans* (3,3% de isolamento). A sorogrupagem em meio CGB confirmou os isolados como pertencentes ao sorogrupo AD, correspondendo às variedades *neoformans* e/ou *grubii*, uma vez que o sorotipo não foi determinado.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Foram apreendidos 150 insetos, todos pertencentes à espécie *Periplaneta americana*, sempre em locais públicos em cujo ambiente interno fora previamente

confirmada a positividade para *Cryptococcus* spp. A maioria das apreensões ocorreu nos meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro, período coincidente com temperaturas mais altas e mais propícias para o desenvolvimento das baratas (32).

O percentual de isolamento de *Cryptococcus neoformans* em baratas foi de 3,3%, aproximadamente duas vezes maior que o obtido em relato anterior (31), sendo este o primeiro obtido de baratas no Brasil. Pode-se considerar que a espécie *Periplaneta americana* se caracteriza como potencial vetor desta levedura, embora dependa da presença do agente no ambiente, o que não é incomum. É possível que o isolamento obtido se deva ao fato de o trabalho haver se restringido a ambientes em que a levedura estava presente. É provável, no entanto, que este índice seja muito maior que o verificado, pois, no período em que os insetos se encontravam em armadilhas, poderiam sofrer modificação do conteúdo microbiano interno uma vez que a alimentação disponível no interior da armadilha era diferente daquela encontrada no ambiente.

As edificações públicas frequentemente apresentam colonização por pombos em seus telhados e sótãos, além de outras áreas, o que produz um acúmulo de excretas destas aves. Como consequência, frequentadores destes ambientes podem ser infectados por estas leveduras e outros patógenos. Nestes locais, as baratas representam um risco adicional em razão de serem insetos sinantrópicos e da existência de falhas na higiene tanto em residências como em locais públicos. Além disso, baratas movem-se sobre diversas superfícies, incluindo as áreas de preparo de alimentos e os próprios alimentos humanos e de animais e possuem o hábito da coprofagia e o da regurgitação. Portanto, baratas representam um risco em potencial para a saúde dos frequentadores de escolas, igrejas e dos eventuais ou habituais frequentadores de hospitais. Nesta pesquisa, o maior percentual de isolamentos ocorreu em um CIEP. Tal fato é importante uma vez que este é um ambiente frequentado, predominantemente, por crianças. Há um risco de exposição a *Cryptococcus* spp quando o homem é jovem, visto que pode haver reativação da infecção latente na idade adulta, conforme preconiza a literatura (26). Por outro lado, indivíduos de outras faixas etárias que possuam algum tipo de comprometimento imunológico também estão sob risco, uma vez que os insetos são domiciliares ou peridomiciliares e podem funcionar como vetor de *Cryptococcus neoformans*. A sorogrupagem revelou que todos os isolados pertenciam ao sorogrupo AD. Este fato assume relevância ante a constatação de que, no Brasil e no mundo, as cepas isoladas de casos clínicos, incluindo portadores do HIV, são predominantemente do sorotipo A (25, 29) e as cepas ambientais são também predominantemente do mesmo sorotipo, com exceção da Europa, onde a prevalência é do sorotipo D (21).

É pertinente atentar para o problema do saneamento urbano no Brasil. A grande maioria das cidades tem um sistema de esgotamento sanitário deficiente e, mesmo nos casos em que a rede de esgoto é satisfatória, percebe-se que existem falhas estratégicas ou mesmo descaso no combate a insetos sinantrópicos e a outras pragas urbanas que funcionam como vetores de agentes patogênicos. Igualmente

preocupante é a presença de pombos nos grandes centros brasileiros e de todo o mundo (1, 21). Originárias das montanhas, estas aves encontram-se adaptadas ao meio urbano e habitam as partes altas de prédios e praticamente dividem espaço com os seres humanos. Suas excretas são a principal fonte saprofítica do agente em estudo e de outros patógenos importantes e não existem estratégias formuladas para o controle destas aves, tampouco a conscientização da população acerca do perigo que representam.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans isolated from *Periplaneta americana* collected from public environments and its relevance to human and animal health

The objective of this paper was to check the presence of *Cryptococcus neoformans* in cockroaches (*Periplaneta Americana*) collected in public places. The research's motivation was based on the fact that this species of cockroach are synanthropic and vehicle of several pathogenic agents for men and animals, a relevant fact for public health. A total of 150 samples were collected and the research for the presence of the agents in the insects was conducted in the Laboratory of Pathogenic and Environmental Yeasts, Department of Microbiology and Immunology Veterinary, UFRRJ, by processing of the exoskeleton and the internal content and sowing in cultivation medium containing dopamine. The confirmation of isolation was made by the macromorphology and micromorphology tests, performance of auxanographic method, and complementary proofs. Isolation of *Cryptococcus neoformans* was not obtained from the exoskeleton. Five isolates (3.3%) were obtained from the internal content of the insects. The serogrouping in CGB medium showed that they were from the AD serum group. We consider that the cockroaches of the species *Periplaneta americana* are a potential vector for the studied yeast.

KEY WORDS: *Cryptococcus neoformans*. Cockroaches. Schools. Hospitals. Churches.

REFERÊNCIAS

1. Baroni FA, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTB, Gambale W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 48: 71-75, 2006.
2. Campos FL, Baroni FA. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. *Rev Patol Trop* 39: 83-89, 2010.
3. Fonseca A, Boekhout T, Fell JW. *Cryptococcus*. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, eds. *The Yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, New York, 2011.
4. Fotedar R & Banerjee U. Nosocomial fungal infections – study of the possible role of cockroaches (*Blattella germanica*) as vectors. *Acta Trop* 50: 339-343, 1992.

5. Kurtzman CP, Fell, JW. In: *The Yeasts: a taxonomic study*. Elsevier 4^a ed, New York, 1998.
6. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). *J Clin Microbiol* 15: 535-537, 1982.
7. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Cryptococcosis. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, eds. *Medical Mycology* 1st ed. Lea & Febiger: Philadelphia, 1992.
8. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell TJ, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 51: 804-806, 2002.
9. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Wickes B, Fell JW. Systematics of the Genus *Cryptococcus* and its type species *C. neoformans*. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall, eds. *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM Press, Washington, 2011.
10. Lazéra MS, Cavalcanti MAS, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Med Mycol* 36: 119-122, 1998.
11. Lazéra MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 38: 379-383, 2000.
12. Lamiaa B, Mariam L, Ahemed A. Bacteriological analysis of *Periplaneta Americana* L. (Diptera, Blattellidae) and *Musca domestica* L. (Diptera, Muscidae) in ten districts of Tangier, Morocco. *Afr J Biotechnol* 6: 2038-2042, 2007.
13. Lemos AA, Lemos JA, Prado MA, Pimenta FC, Gir E, Silva HM, Silva, R. Cockroaches as carriers of fungi of medical importance. *Mycoses* 49: 23-25, 2006.
14. Marques SMT, Quadros RM, Silva CJ, Baldo M. Parasites of pigeons (*Columba livia*) in urban áreas of Lages, Southern Brazil. *Parasitol Latinoam* 62: 183-187, 2007.
15. Mitchell TG, Castañeda E, Nielsen K, Wanke B, Lazéra MS. Environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A., eds. *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast. ASM Press: Washington, 2011.
16. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 8: 515-548, 1995.
17. Miranda RA, Silva JP. Enterobactérias isoladas de *Periplaneta americana* capturadas em um ambiente hospitalar. *Ciência et Praxis* 1: 21-24, 2008.
18. Montenegro H, Paula, CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Med Mycol* 38: 385-390, 2000.
19. Mpuchane S, Allotey J, Matsheka I, Simpanya S, Coetzee S, Jordaan A, Mrema N, Gashe BA. Carriage of micro-organisms by domestic cockroaches and implications on food safety. *Int J Trop Insect Sci* 26: 166-175, 2006.
20. Pai HH, Chen WC, Peng CF. Cockroaches as a potencial vectors of nosocomial infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25: 979-984, 2004.
21. Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45: 299-305, 2003.
22. Pedroso RS, Ferreira JC, Candido RC. The isolation and charcterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiol Res* 164: 221-227, 2009.
23. Pérez JR. La cucaracha como vector de agentes patógenos. *Bol Oficina Sanit Panam* 107: 41-53, 1989.
24. Prado MA, Pimenta FC, Hayashid M, Souza PR, Pereira MS, Gir E. Enterobactérias isoladas de baratas (*Periplaneta americana*) capturadas em um hospital brasileiro. *Rev Panam Salud Publica* 11: 93-97, 2002.
25. Rinaldi MG, Drutz DJ, Howell A, Sande MA, Wofsy CB, Hadley WK. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J Infect Dis* 153: 642, 1986.

26. Rozenbaum R, Gonçalves AJ. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. *Clin Infect Dis* 18: 369-380, 1994.
27. Saichua P, Pinmai K, Somrithipol S, Tor-Udom S. Isolation of medically important fungi from cockroaches trapped at Thammasat Chalermprakiat Hospital. *Thammasat Medical Journal* 8: 345-351, 2008.
28. Salehzadeh A, Tavacol P, Mahjub H. Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospitals of Hamadan, Iran. *J Vect Borne Dis* 44: 105-110, 2007.
29. Shimizu RY, Howard DH, Clancy MN. The variety of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J Infect Dis* 154: 1042, 1986.
30. Swinne D, Eyckmans L. Isolement de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* du tube digestif de blattes (*Periplaneta americana*). *Med Mal Infect* 14: 619, 1984.
31. Swinne D, Kayembe K, Niyimi M. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* in Kinshasa, Zaire. *Ann Soc Belg Med Trop* 66: 57-61, 1986.
32. Vianna EES, Berne MEA, Ribeiro PB. Desenvolvimento e longevidade de *Periplaneta americana* Linneu, 1758 (Blattodea: Blattellidae). *Rev Bras Agrociência* 7: 111-115, 2001.
33. Vianna EES, Berne MEA, Chernaki AM, Silveira P, Ribeiro PB. Performance reprodutiva de *Periplaneta americana* Linneu, 1758 (Blattodea: Blattellidae). *Arq Inst Biol* 67: 99-107, 2000.