

**DORACILDE TERUMI TAKAHARA**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* A  
PARTIR DE EXCRETAS DE POMBOS PROVENIENTES DE LOCAIS  
PÚBLICOS E RESIDENCIAIS DE CUIABÁ E VÁRZEA GRANDE – MT**

**Universidade Federal de Mato Grosso  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação  
Mestrado em Ciências da Saúde  
Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais**

**CUIABÁ – MT  
2011**

**Universidade Federal de Mato Grosso  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação  
Mestrado em Ciências da Saúde  
Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* A  
PARTIR DE EXCRETAS DE POMBOS PROVENIENTES DE LOCAIS  
PÚBLICOS E RESIDENCIAIS DE CUIABÁ E VÁRZEA GRANDE – MT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências da Saúde**, Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosane Christine Hahn**

**Cuiabá – MT  
2011**

### Dados Internacionais de Catalogação na Fonte

T136i Takahara, Doracilde Terumi.

Isolamento e identificação de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de pombos provenientes de locais públicos e residenciais de Cuiabá e Várzea Grande - MT / Doracilde Terumi Takahara. -- 2011. xxi, 77 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Rosane Christine Hahn.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Cuiabá, 2011.

Inclui bibliografia.

1. *Cryptococcus neoformans* – Cuiabá, MT. 2. Excretas de pombos. 3. Pombos - *Cryptococcus neoformans*. 4. *Cryptococcus neoformans* – Epidemiologia. I. Título.

CDU 582.284:[591.149:598.65](817.2)

Ficha Catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Jordan Antonio de Souza - CRB1/2099

**Permitida a reprodução parcial ou total desde que citada a fonte**

**UFMT**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**

**Reitora**

Dr. Maria Lúcia Cavalli Neder

**Vice-Reitor**

Prof. Dr. Francisco José Dutra Souto

**Pró-Reitora de Pós-Graduação**

Dra. Leny Caselli Anzai

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Coordenador**

Prof. Dr. Amilcar Sabino Damazo

*“Sem o amor a vida não tem alicerces  
Sem a fé a existência é uma coroa sem brilhantes  
Sem a esperança a vida é uma espantosa nuvem vazia  
Sem sonhos o ser humano é um jardim sem sementes  
Sem imaginação o viver não tem laços que atem as diferenças humanas  
Sem humildade as riquezas são marés adversas  
Sem cuidar do jardim dos pensamentos, o viver deixa de ser uma canção e as  
emoções se tornam prisões em vez de danças  
Mas com Deus a morte é a porta de entrada para a festividade insondável  
Cuidar de nosso jardim é possível e necessário!”*

*(Silas Barbosa Dias, “No Jardim do Pensador”, Editora Culthrix, São Paulo, 2008)*

**Dedicatória:**

*“Aos meus pais biológicos e adotivos (in memoriam), pelo presente da minha vida e pelos primeiros ensinamentos em direção ao conhecimento fundamentado no progresso intelectual-moral;*

*Àqueles que anonimamente contribuem para o progresso da ciência através do trabalho persistente e incansável;*

*Àqueles pensadores grandiosos, mas, humildes no ser que realizam a tarefa de semeadura para crianças e jovens;*

*Àqueles espíritos humanos, caracterizados pelo potencial da criação e imaginação, e principalmente da sua objetividade;*

*Àqueles que acreditam no exercício diário da paciência, da perseverança e da esperança no bem;*

*Àqueles que se doam integralmente, e se iluminam pelo seu incondicional doar, à revelia da justiça ou das leis humanas, pois acreditam nas leis naturais do Criador e assim se conduz em paz;*

*À minha família, através da qual realizo o meu aprendizado, aos queridos filhos Douglas Hideki Takahara e Augusto Kenji Takahara tesouros de minha existência, ao pai deles, William Koiti Takahara e sua família que me apoiaram, incentivaram e possibilitaram a realização desse projeto;*

*Às amigas que não permitiram desistir desse sonho, pela presença constante durante esse período, pela confiança, pela parceria, pelas orações, pelos momentos inesquecíveis vividos juntas;*

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho e possibilitaram assim, estudar mais detidamente sobre a doença, a importância do diagnóstico correto para obtenção de um tratamento eficaz, cuja diferença reside em salvar vidas”.*

## Agradecimentos

*Ao criador de todo o Universo e todas as coisas, DEUS nosso Pai.*

Por estender sempre suas infinitas bênçãos, em todos os momentos de minha vida...

*À orientadora e amiga: **Rosane Christine Hahn***

Por tudo que ela representa e é, pelo exemplo de profissional competente, trabalhadora incansável em prol do progresso científico, professora experiente, com enorme capacidade, educadora exemplar e acima de tudo, pessoa valorosa, de conteúdo ético e exemplar que reflete seu ser e sua conduta. Pelo que representa para mim, pela sensibilidade e beleza interior de que despoja sua alma, pela luz que propaga, pela força interior que ela detém e repassa sob a forma de estímulos e agradecimentos a todos, que trabalham ao seu lado, pela sua sublime educação, humildade e simplicidade, contrastando com o enorme ser humano que ela realmente é.

Pela oportunidade concedida desse aprendizado, pela experiência de poder conviver e de interagir com diferentes profissionais, no laboratório ou nos hospitais por onde trabalhei. Pela abertura de novos horizontes, através desse trabalho, de paciência, de persistência, de reflexão e amadurecimento, permitindo não apenas nossa transformação intelectual, como também, a nossa elevação profissional e pessoal. Pelo prazer de tê-la como orientadora e mestre, a minha máxima gratidão e o meu imenso carinho por tudo que ela significa e ela sabe, pela a oportunidade que tive de sentir e dividir pensamentos, elevo e elevarei sempre meu agradecimento a Deus por tê-la presente em minha vida, em especiais e decisivos momentos de minha vida. Sinto-me muito agradecida e feliz...

*À UFMT / Diretor da FM/ UFMT – Dr. Antonio José de Amorim*

*Às secretárias Keylla Okada da Coordenação da Pós Graduação da FM/UFMT e Eliana Silva da Coordenação da Pós Graduação da FM/UFMT*

*A todos os professores:*

*Profº Dr. Cor Jésus Fernandes Fontes, Dr. Francisco José Dutra Souto, Drª Denise Bergamachi, Drª Carmen Lucia Bassi, Drª Bianca Borsatto Galera, Dr. Amílcar Sabino Damazo, Drª Rosane Christine Hahn e todos os outros professores que iluminaram nossos caminhos com as sementes do conhecimento e da experiência.*

*Todos os técnicos o meu reconhecimento e carinho de que não caminhei sozinha para conseguir alcançar esse sonho: Sr. Nilson Botelho (LI), Edmar Luis da Silva (LI), Gevanil Lene Arruda (LI). “Nicole” (HGU e Acy (HGU), Vocês fazem parte de tudo isso...*

*Todos os colegas: Ana Paula Zanetti Feuser Mahfouz, Hécio A. Bianchi, Sabrina Monteiro Tosoncin da Silva, Daniele Ribatsky, Samantha Almeida)*

*Todos os diretores dos hospitais que autorizaram a realização desse projeto:*

*Hospital Geral Universitário – Dr. Ney Pereira*

*Hospital Universitário Júlio Muller - Dr<sup>a</sup> Olga Akiko Takano*

*Hospital Santa Rosa – Dr. Cervantes Caporossi*

*Hospital Jardim Cuiabá – Dr. Fares Hamed A. Fares*

*Pronto Socorro de Várzea Grande - Dr. João Santana*

*Santa casa de Misericórdia - Sr<sup>a</sup> Candelária Elizabeth Oliveira Sabóia*

*Clinica Femina - Dr. Joaquim Pinto de Oliveira Neto*

*Hospital São Mateus - Dr. Altino José de Souza*

*Todos os bioquímicos, biomédicos e médicos que agregaram sua importante participação nesse projeto:*

*Dr. Rubens Redivo e Dr. Ézio Aléssio do Laboratório Exame*

*Dr. Oscar Augusto da Costa Marques do Laboratório Hemaclin*

*Dr. José Joel Vieira e Dr. Jerolino Lopes Aquino do Laboratório Carlos Chagas*

*Dr<sup>a</sup> Izabel Cristina Bouchese do Laboratório Santa Rosa*

*Dr<sup>a</sup> Silvana Salomão Cury do Laboratório do HUJM*

*Dr. Nestor A de Aguiar Junior do laboratório HGU*

*Dr<sup>a</sup> Rita Aurélia Proença Malaquias do laboratório do PSMVG*

*Dr<sup>a</sup> Natasha Shhessarenko do Laboratório Cedilab*

*Dr. Marcelo Adriano Mendes dos Santos do MT Laboratório*

*Todos os bioquímicos/biólogos do setor de microbiologia*

*Marilete Luiza Zago Toebe e Darci Moisés da Silva do Lacen-MT*

*Évelin Rodrigues Martins, Ana Carolina Akeme Yamamoto e Diniz Pereira Leite Junior do HGU*

*Milena Melges Pesenti e Breno Panes do Laboratório Hemaclin*

*Rubens Redivo e Wesley André da Silva do laboratório Exame*

*Agradecimento especial à Tomoko Tadano, pela dedicação, apoio, competência, responsabilidade e participação nesse projeto...*

*Meu carinho e gratidão à todos do Hospital Veterinário: Em especial, à Daphine de Paula pelos ensinamentos práticos e proveitosos ao final de nossa jornada...Aos prof(s) Dr. Luciano Nakasato e Dr<sup>a</sup> Valéria Dutra por possibilitar a realização da identificação genotípica de todos os isolados obtidos.*

*Aos colegas do ambulatório III do HUJM, Maria e Jorge, Maria da Guia e Gisele (Núcleo de Vigilância epidemiológica), Creuza, Ana Paula, Ávila, Marlete, Dr Luciano Correa Ribeiro, Dr<sup>a</sup> Érica, Dr<sup>a</sup> Ana Paula...*

*Aos colegas do LI, Msc. Luciana Basilli , Msc. Olivia Cometi Favalessa, Msc. Ana Caroline Akeme Yamamoto.*

*Aos amigos: Janaína Vasconcellos Ribeiro de Souza Amadio pelo apoio e incentivo... Walquyria Borges Simi, pela participação especial e auxílio nas coletas, meu carinho e gratidão... Hugo Dias Hoffman dos Santos e Diniz Pereira Leite Junior, equipe poderosa da força tarefa, ao final do ano que findou ... Amigos para todos os momentos... para todos os lugares... Fábio Alexandre, pela ajuda valiosa para formatação dessa dissertação e demais contribuições durante todo o mestrado...*

*À Mariana Caselli Anzai, ... Jovem de especial traço, lutadora e corajosa, alegre e transparente, colega com quem convivi e partilhei muitos momentos...*

*À querida amiga Fátima Dib Horta, “nosso” pai Abrão Dib e Saluha Dib, pelo carinho e apoio, pela imensa generosidade com que me receberam e me fizeram sentir membro de sua querida família, com o coração cheio de amizade, de ternura, de respeito e simplicidade, aceitando me como sou.*

*Aos doutores Márcia dos Santos Lazéra, Bodo Wanke e Luciana Trilles do IPEC-FIOCRUZ, nossos agradecimentos pela generosidade e importância dos valiosos ensinamentos, experimentos e conhecimentos repassados a todos nós... Ao apoio irrestrito da Dr<sup>a</sup> Claudete Rodrigues de Paula da USP e sua abençoada presença, profissional e*

*pessoal... E a todos os colaboradores do Laboratório de Investigação da UFMT, meu carinho e gratidão é muito pouco do muito que recebi e aprendi com vocês...Muito obrigada!!...*

## Sumário

|                                                                                      |          |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Dedicatória:.....                                                                    | v        |
| Agradecimentos.....                                                                  | vii      |
| LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS .....                                                  | xiv      |
| LISTA DE TABELAS .....                                                               | xvii     |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                               | xviii    |
| RESUMO .....                                                                         | xx       |
| ABSTRACT .....                                                                       | xxi      |
| <b>1.Relevância e Justificativa.....</b>                                             | <b>1</b> |
| <b>2.Revisão de Literatura.....</b>                                                  | <b>5</b> |
| 2.1 HISTÓRICO .....                                                                  | 5        |
| 2.2 ECOLOGIA .....                                                                   | 6        |
| 2.2.1 Pombos e aves migratórias.....                                                 | 6        |
| 2.2.2 Taxonomia.....                                                                 | 7        |
| 2.2.3 Sorotipos de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i> ..... | 8        |
| 2.2.4 Nicho ecológico de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....                        | 8        |
| 2.2.5 Pombos: Reservatórios ou Portadores simples.....                               | 10       |
| 2.2.6 Mecanismo de transmissão.....                                                  | 11       |
| 2.2.7 Ciclo de vida das leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i> .....                | 11       |
| 2.2.8 Fonte de <i>Cryptococcus neoformans</i> e “não neoformans” no solo.....        | 12       |
| 2.2.9 Sorotipo AD .....                                                              | 13       |
| 2.3 EPIDEMIOLOGIA DE <i>C. neoformans</i> .....                                      | 13       |
| 2.3.1 No mundo .....                                                                 | 13       |
| 2.3.2 No Brasil .....                                                                | 14       |
| 2.3.3 Região Centro Oeste.....                                                       | 15       |
| 2.4. CRIPTOCOCOSE.....                                                               | 16       |
| 2.4.1 Criptococose e AIDS.....                                                       | 17       |
| 2.4.2 <i>Cryptococcus neoformans</i> .....                                           | 18       |

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5. FATORES DE VIRULÊNCIA .....                                   | 19 |
| 2.5.1 – Cápsula polissacarídica .....                              | 19 |
| 2.5.2 – Lacase e melanina .....                                    | 20 |
| 2.5.3 - Fosfolipase .....                                          | 20 |
| 2.5.4 - Urease .....                                               | 21 |
| 2.5.5 - Proteinases .....                                          | 21 |
| 2.5.6 - <i>Mating types</i> .....                                  | 21 |
| 2.5.7 - Crescimento a 37° C .....                                  | 22 |
| 2.6. PATOGENIA .....                                               | 22 |
| 2.7. CRIPTOCOCOSE E A BIOLOGIA MOLECULAR .....                     | 24 |
| 2.7.1 Contribuições das técnicas na criptococose .....             | 25 |
| <b>3.Objetivos</b> .....                                           | 27 |
| 3.1 Objetivo Geral:.....                                           | 27 |
| 3.2 Objetivos Específicos:.....                                    | 28 |
| <b>4. Métodos</b> .....                                            | 29 |
| 4.1 Tipo de Estudo: .....                                          | 29 |
| 4.2 Amostragem: .....                                              | 29 |
| 4.3 Períodos e locais selecionados para a coleta das amostras..... | 29 |
| 4.3.1 Períodos.....                                                | 29 |
| 4.3.2 Locais .....                                                 | 29 |
| 4.3.2.1 - Grupo I (Praças).....                                    | 30 |
| 4.3.2.2 - Grupo II (Igrejas) .....                                 | 30 |
| 4.3.2.3 - Grupo III (Universidades/Escolas).....                   | 30 |
| 4.3.2.4 - Grupo IV (Unidades de saúde).....                        | 31 |
| 4.3.2.5 - Grupo V (áreas abertas com cobertura de amianto).....    | 31 |
| 4.3.2.6 - Grupo VI (residenciais).....                             | 31 |
| 4.3.2.7 - Grupo VII (fábrica) .....                                | 32 |
| 4.3.2.8 - Grupo VIII (presídio).....                               | 32 |

|                                                                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4 Critérios de inclusão.....                                                                                          | 35        |
| 4.5 Critérios de exclusão.....                                                                                          | 35        |
| 4.6 Local de estudo .....                                                                                               | 35        |
| 4.7 Processamento das amostras: .....                                                                                   | 35        |
| 4.7.1 Cultura e identificação .....                                                                                     | 37        |
| 4.7.2 Teste da Urease .....                                                                                             | 38        |
| 4.7.3 Identificação fenotípica em meio CGB (Canavanina Glicina Azul de Bromotimol).....                                 | 38        |
| 4.7.4 Teste confirmatório pela PCR (Polymerase Chain Reaction) .....                                                    | 39        |
| 4.7.4.1 Extração de DNA genômico.....                                                                                   | 39        |
| 4.7.4.2 Realização da técnica de PCR para <i>Cryptococcus neoformans</i> . .....                                        | 39        |
| <b>5. Resultados .....</b>                                                                                              | <b>41</b> |
| 5.1 Isolamento de <i>C. neoformans</i> de excretas de pombos em oito diferentes locais (Grupos: I a VIII) .....         | 41        |
| 5.2 Isolamento de <i>C. neoformans</i> nos 8 grupos avaliados em Cuiabá e Várzea Grande .....                           | 43        |
| 5.3. Amostras coletadas nos períodos (I) e (II) .....                                                                   | 44        |
| 5.4 Positividade associada ao isolamento de <i>C. neoformans</i> em igrejas, instituições de ensino e residenciais..... | 45        |
| 5.5 Percentual de isolamento de <i>C. neoformans</i> em diferentes locais nas 122 amostras coletadas. .                 | 47        |
| 5.6 Locais no mapa do município de Cuiabá (satélite) nos quais foram isolados <i>C. neoformans</i> . .                  | 50        |
| <b>6. Discussão .....</b>                                                                                               | <b>52</b> |
| <b>7. Conclusões.....</b>                                                                                               | <b>61</b> |
| <b>8. Referências.....</b>                                                                                              | <b>62</b> |
| <b>9. Anexos .....</b>                                                                                                  | <b>75</b> |

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C – Graus Celsius

µL – microlitro

µM – micromolar

7H<sub>2</sub>O.MgSO<sub>4</sub> – Sulfato de magnésio hepta-hidratado

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

*C. gattii* – *Cryptococcus gattii*

*C. neoformans* – *Cryptococcus neoformans*

CERMAC - Centro Estadual de Referência em Média e Alta Complexidade

CGB - Canavanina Glicina Azul de Bromotimol

cm – centímetro

CMV- Citomegalovirus

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

EDTA – Etileno diamino tetraacético

FAMEV – Faculdade de Medicina Veterinária

FM – Faculdade de Medicina

g – gramas

GalXM - Galactoxilomanana

GXM - Glicuroxilomanana

HCl – Ácido Clorídrico

HIV - Human Immunodeficiency Virus

KCl – Cloreto de Potássio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato dibásico de Potássio

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

LI - Laboratório de Investigação

M - molar

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

mL – mililitro

MLST - Multilocus Sequence Typing

mM - milimolar

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

ng - nanograma

NSA - Niger Seed Agar

pb – pares de bases

PCR – Reação em cadeia de polimerase

pH – potencial de hidrogênio

pM – picomolar

PPGCS – Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde

RAPD - Randomly Amplified Polymorphic DNA

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

SESC – Serviço Social do Comércio

SNC - Sistema Nervoso Central

U – Unidade

UFC- Unidades Formadoras de Colônias

UFMT - Universidade Federal de Mato Grosso

UNIC – Universidade de Cuiabá

V – Volts

## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Gráfico 1</b> – Distribuição dos tipos de locais avaliados com presença de pombos<br>.....            | 41 |
| <b>Gráfico 2</b> – Distribuição dos tipos de locais avaliados com presença de pombos e<br>excretas ..... | 42 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> – Tipos e número de locais investigados (Grupos) e positividade (%) associada à presença de <i>Cryptococcus neoformans</i> em excretas de pombos .....                                       | 43 |
| <b>Tabela 2</b> – Percentual de isolamento de <i>C. neoformans</i> em diferentes grupos de ambientes de Cuiabá e Várzea Grande, MT, em relação a presença de excretas e ao número de locais pesquisados..... | 44 |
| <b>Tabela 3</b> – Distribuição de amostras coletadas nos períodos (I) e (II) em locais distintos (grupos I a VIII).....                                                                                      | 45 |
| <b>Tabela 4</b> – Positividade associada ao isolamento de <i>C. neoformans</i> nas Escolas / Instituições de ensino avaliadas no município de Cuiabá (MT).....                                               | 46 |
| <b>Tabela 5</b> – Positividade associada ao isolamento de <i>C. neoformans</i> nas igrejas avaliadas no município de Cuiabá (MT) .....                                                                       | 46 |
| <b>Tabela 6</b> – Positividade associada ao isolamento de <i>C. neoformans</i> nos residenciais avaliados no município de Cuiabá (MT) .....                                                                  | 47 |
| <b>Tabela 7</b> – Percentual de isolamento de <i>C. neoformans</i> em diferentes grupos em relação ao número total de amostras coletadas .....                                                               | 48 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Praça Santos Dumont.....                                      | 33 |
| <b>Figura 2</b> – Praça Rachid Jaudy .....                                      | 33 |
| <b>Figura 3</b> – Igreja Nossa Senhora do Bom Despacho .....                    | 33 |
| <b>Figura 4</b> – Instituição de ensino UNIC .....                              | 34 |
| <b>Figura 5</b> – Unidade de Saúde CPA II .....                                 | 34 |
| <b>Figura 6</b> – Presídio – Centro de ressocialização do bairro Planalto ..... | 34 |
| <b>Figura 7</b> – Amostras de dejetos de pombos em coletores.....               | 36 |
| <b>Figura 8</b> – Pesagem das amostras .....                                    | 36 |
| <b>Figura 9</b> – Excretas após pesagem .....                                   | 36 |
| <b>Figura 10</b> – Transferência para o gral de porcelana .....                 | 36 |
| <b>Figura 11</b> – Maceração/ trituração.....                                   | 36 |
| <b>Figura 12</b> – Transferência para o erlenmeyer .....                        | 36 |
| <b>Figura 13</b> – Solução fisiológica com cloranfenicol (0,4%) .....           | 37 |
| <b>Figura 14</b> – Agitação .....                                               | 37 |
| <b>Figura 15</b> – Suspensão de amostras .....                                  | 37 |
| <b>Figura 16</b> – Transferência para placa com meio Niger .....                | 37 |
| <b>Figura 17</b> – Semeadura com alça de drigalski .....                        | 37 |
| <b>Figura 18</b> – Placas com meio Niger após semeadura .....                   | 37 |
| <b>Figura 19</b> – Teste da ureia.....                                          | 38 |

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 20</b> – Meio de CGB (Canavanina Glicina Azul de Bromotimol).....                                                       | 38 |
| <b>Figura 21</b> – Meio de NSA... ..                                                                                              | 38 |
| <b>Figura 22</b> – Amplificação por PCR de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....                                                   | 49 |
| <b>Figura 23</b> – Mapa do município de Cuiabá da região na qual foram isolados<br><i>Cryptococcus neoformans</i> (satélite)..... | 50 |
| <b>Figura 24</b> – Mapa do município de Cuiabá da região na qual foram isolados<br><i>Cryptococcus neoformans</i> .....           | 51 |

## RESUMO

Com objetivo de avaliar a presença de *C. neoformans* em locais públicos e residenciais de Cuiabá e Várzea Grande – MT, foram obtidas 122 amostras de excretas ressecadas de pombos, subdivididos em oito grupos diferentes: praças públicas (n=5), igrejas (n=4), instituições de ensino (n=3), unidades de saúde (n=8), áreas abertas exibindo cobertura de amianto (n=4), conjuntos residenciais domiciliares (n=23), fábrica (n=1), presídio (n=1). A metodologia utilizada consistiu de semeadura em meio niger (NSA), identificação fenotípica pelo teste da urease, quimiotipagem em CGB (meio de canavanina-glicina e azul de bromotimol), das colônias isoladas com pigmentação de coloração marrom escura. Para confirmação genotípica dos isolados foi utilizada a técnica da PCR (Reação em cadeia da polimerase). As amostras foram coletadas em dois períodos: I (julho agosto e setembro) e II (outubro, novembro e dezembro). Foram isoladas leveduras apenas no período II. *C. neoformans* associado às excretas de pombos foi isolado em oito de cento e vinte e duas amostras (6,6%) sendo encontrado em duas de quatro igrejas das treze amostras analisadas, em uma de três escolas das treze amostras analisadas; e em cinco de vinte e três residenciais das quarenta e quatro amostras analisadas.

Foram avaliados maior número de residenciais (n=23), obtendo-se consequentemente maior número de amostras provenientes destes locais (n=44). Através dos resultados obtidos foi possível confirmar a identidade genotípica dos isolados de *C. neoformans* em locais públicos (igrejas e instituição de ensino) e residenciais nos municípios de Cuiabá e Várzea Grande.

Palavras chaves: *Cryptococcus neoformans*, excretas de pombos, áreas públicas e urbanas, Mato Grosso

## ABSTRACT

In order to evaluate the presence of *C. neoformans* in public places and residential areas from Várzea Grande and Cuiabá - MT, 122 samples were obtained from dried pigeon excreta, subdivided into eight different groups: public squares (n = 5), churches (n = 4), educational institutions (n = 3), health units (n = 8), open areas showing asbestos coverage (n = 4), residential areas (n = 23), plant (n = 1), prison (n = 1). The methodology consisted of inoculation in niger seed agar (NSA), phenotypic identification by the urease test, and chemotyping by CGB (canavanine-glycine bromothymol blue medium), of the isolated colonies with dark brown pigmentation. For the genotypical confirmation of the isolates, PCR (polymerase chain reaction) was performed. The samples were obtained in two periods: I (July, August and September) and II (October, November and December). Yeasts were isolated only in period II. *C. neoformans* associated with pigeon excreta was isolated from eight out of a hundred and twenty-two samples (6.6%) being found in two of the four churches, out of thirteen samples, in one of three schools in thirteen samples, and in five of twenty three residential areas, in forty-four samples. We evaluated a large number of residential areas (n = 23), thus obtaining a larger number of samples from these sites (n = 44). Through these results it was possible to confirm the genotypical identity of *C. neoformans* in public places (churches and educational institution) and residential areas in the cities of Cuiabá and Várzea Grande.

**Key-words:** *Cryptococcus neoformans*, pigeon excreta, public and urban areas, Mato Grosso.

## 1. Relevância e Justificativa

Infecções oportunistas são cada vez mais frequentes em organismos imunocomprometidos e representam aspecto importante em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida.<sup>1</sup>

A criptococose é uma doença estudada há muito tempo (desde 1894). Entretanto, somente nos últimos 40 anos, ela apresenta avanços importantes referentes à taxonomia, epidemiologia, estrutura capsular, fatores de virulência, sorotipos e genótipos específicos. No Brasil, observam-se relatos na maioria dos estados, e no estado de Mato Grosso especificamente, pouco ainda foi estudado no que tange tanto à isolados clínicos ou ambientais de leveduras agentes da criptococose.

A criptococose é uma micose sistêmica grave causada por dois fungos pertencente ao gênero *Cryptococcus* que acometem tanto homens como animais: *C. neoformans* e *C. gattii*.<sup>2,3</sup> É cosmopolita e emergente respectivamente, como consequência da interação homem versus meio ambiente.<sup>1,4,5</sup>

A frequência da criptococose no Brasil em pacientes com AIDS, em ordem de prevalência, é a segunda maior que acomete esse grupo de risco, perdendo apenas para a candidíase.<sup>6</sup> O impacto pós era HAART (Highly Active AntiRetroviral Treatment), reflete o controle da multiplicação do vírus HIV e portanto o aumento das chances de sobrevivência. Contudo, as recidivas continuam a ocorrer, o que pode sinalizar ainda na direção de estudos mais detalhados correlacionando-os à essa doença fúngica.<sup>7</sup> Estudos multicêntricos norte-americanos e europeus demonstraram uma redução da incidência de infecções oportunistas (incluindo a criptococose) após a introdução dos antirretrovirais.<sup>8</sup>

O aparecimento de criptococose em imunocompetentes, especialmente em crianças, na Região Norte - Nordeste do Brasil, por *Cryptococcus gattii*, suscita um olhar mais crítico e profundo sobre a doença. Na região Sul do Brasil vem ocorrendo inclusive em crianças com faixa etária inferior a dois anos. Atualmente verifica-se que a doença não está apenas associada a grupos imunocomprometidos como os portadores de HIV, mas a também outros compostos por indivíduos imunocompetentes.<sup>9,10,11</sup>

A criptococose apresenta uma taxa de morbidade e mortalidade elevada em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana.<sup>11</sup> Micoses sistêmicas são consideradas causas de morte importantes estudadas por meio de necropsias. Um estudo ocorrido entre 1996 a 2006, revelou mortes por micoses sistêmicas no Brasil. Por meio de 3583 necropsias realizadas nesse período e colocando como referência a AIDS, como causa principal de morte, e observando-se associação com infecção fúngica, a criptococose apareceu como a principal doença fúngica (50,9%), seguida de candidíase (30,2%), histoplasmosse (10,1%) e outras.<sup>12</sup> RIBEIRO et al. (2008)<sup>13</sup>, em Cuiabá, no período de 2005 a 2008, relataram uma prevalência de 53,3% de óbitos por criptococose em 1300 pacientes aidéticos, quadro muito semelhante ao estudo anteriormente citado dentro do grupo de infecção por fungos neste grupo de pacientes.

A presença de *Cryptococcus neoformans* no solo e em dejetos antigos de pombos têm sido amplamente estudada em diversos países do mundo.<sup>14,15</sup> Dejetos de aves são considerados substratos naturais para *C. neoformans*. Pombos inclusive podem transportar em seus bicos, penas, e pernas, bem como apresentar colonização por este agente no papo. Funcionam como reservatórios e dispersores no ambiente, gerando fonte de infecção para humanos. Quanto ao habitat primário de *C. neoformans*, podem ser consideradas espécies de plantas, madeiras envelhecidas, locais onde as leveduras naturalmente podem desenvolver seu estado sexuado.<sup>16</sup>

Pelo exposto anteriormente, verifica-se a necessidade de avaliar a possível distribuição das leveduras de *C. neoformans* em ambientes públicos pertencentes à cidade de Cuiabá (principal núcleo urbano do estado com cerca de 800 mil habitantes) e Várzea Grande em Mato Grosso, considerando-se a ausência absoluta de dados registrados até o momento na literatura.

Vale ressaltar, que em outras regiões brasileiras (Nordeste, Sul e Sudeste), vários relatos indicam a presença das leveduras de *C. neoformans* em excretas de pombos. Na região Centro-Oeste, também já foram realizados trabalhos nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de isolar e identificar leveduras do gênero *Cryptococcus* em distintos locais públicos (praças públicas, igrejas, instituições de ensino, unidades básicas de saúde, residenciais, fábrica e presídio) nos municípios de Cuiabá e Várzea Grande a partir de excretas de pombos, apresentando caráter inédito no estado de Mato Grosso. A detecção destas leveduras em locais públicos que albergam maior concentração de pombos e possível presença das mesmas em seus excretas, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de propagação e aquisição da doença por indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes. Em Mato Grosso, futuros estudos centrados no binômio hospedeiro-ambiente, poderão contribuir para o conhecimento da eco-epidemiologia das leveduras do gênero *Cryptococcus* no estado.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 HISTÓRICO

A criptococose é uma infecção fúngica oportunista ou primária, causada por duas espécies de leveduras encapsuladas pertencentes ao gênero *Cryptococcus*.<sup>4,17,18,19,20,21</sup> As vias respiratórias constituem a “porta de entrada” da infecção, a qual é frequentemente adquirida através da inalação de propágulos na forma de leveduras dessecadas ou na forma de basidiósporos encontrados no meio ambiente.<sup>22</sup>

É cosmopolita e responsável por infecções que se iniciam no sistema respiratório e podem se disseminar para outros locais, sobretudo para o sistema nervoso central.<sup>23,24</sup>

Atualmente, apresenta-se como uma das doenças de maior frequência entre pacientes com AIDS, alcançando elevados índices de mortalidade, sobretudo na classe imunocomprometida.<sup>25</sup> *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, são os agentes etiológicos causadores da doença tanto em homens como em animais.<sup>23,36</sup>

Em 1894, *C. neoformans* foi isolado pela primeira vez por San Felice em suco de fruta. O fungo recebeu o nome de *Sacharomyces neoformans* em 1895. Houve desde então modificações na taxonomia desse fungo.<sup>17</sup>

Em 1901, Vuillemin reclassifica-os no gênero *Cryptococcus*, com duas espécies, uma vez que não foi observada a presença de ascósporos que caracterizam leveduras do gênero *Saccharomyces*.<sup>27</sup> Apenas uma espécie foi estabelecida em 1950, como agente etiológico para esta micose: *Cryptococcus neoformans*.<sup>28</sup> Nessa época, quatro fenótipos básicos foram identificados pela reatividade de antígenos capsulares de polissacarídeos a soros hiperimunes, denominados sorotipos A, B, C e D.<sup>29,30</sup> Registros referentes aos primeiros casos no Brasil foram relatados inicialmente por Lacaz e Almeida em 1941.<sup>25</sup>

Os primeiros isolamentos de *C. neoformans* do ambiente foram realizados a partir de 1955. Foram encontrados no solo e em excretas de aves, associados especialmente à excretas de pombos. Posteriormente, conseguiu-se estudar a patogenicidade pela demonstração dessa levedura nas lesões, em homens e animais.<sup>27</sup>

Através de técnicas moleculares (RFLP), foi estabelecida a associação dos isolados ambientais e clínicos, pela presença de idênticos genótipos. Desde Emmons (1955)<sup>14</sup>, tem sido descrito o isolamento em excretas de pombos em diversas partes do mundo. Porém, o estado teleomórfico por sua vez, tem sido observado apenas *in vitro*, em condições especiais de laboratório.<sup>2</sup>

Rosário et al. (2008)<sup>31</sup>, sugeriram entre outras aves, os pombos, como reservatórios da levedura, através de técnicas moleculares a partir da identificação de cepas provenientes de isolados clínicos dos pacientes doentes e animais.

## 2.2 ECOLOGIA

### 2.2.1 Pombos e aves migratórias

Aves migratórias podem transmitir vários tipos de leveduras. *Cryptococcus* spp são ubíquos na natureza e podem ser transmitidos aos humanos através de pombos.<sup>32</sup> Aves (psitacídeos) têm o hábito de raspar e fragmentar pedaços de madeira, galhos e parecem oferecer as condições favoráveis de sobrevivência e multiplicação de *C. neoformans* em seus habitats.<sup>33</sup>

O pombo comum chegou ao Brasil no século XVI e possui o nome científico de *Columba livia*. É uma ave considerada mansa, com adaptação nos centros urbanos, onde encontram facilidade de abrigo e de obter alimentos. O excesso deles por outro lado, pode

causar danos ao meio ambiente e à saúde da população. Os pombos alimentam-se de restos de alimentos, pão e inclusive lixo, embora sementes e grãos seja a opção alimentar natural. Geralmente são encontrados de 1 a 2 ovos por ninho, podem produzir de 5 a 6 ninhadas por ano e o tempo médio de incubação dos ovos é de 18 dias. Nos centros urbanos o tempo médio de vida varia de 3 a 5 anos, mas em regiões silvestres podem viver 15 anos.<sup>34</sup>

Pombos coabitam com humanos em áreas urbanas e rurais, porém sua alta densidade populacional concentra-se na zona urbana onde populações humanas interagem com diversos tipos de animais e aves. Pombos em especial, possuem adaptação e agilidade em cidades conturbadas. Excessiva densidade populacional de pombos estimula o desenvolvimento de programas de controle, que visam reduzir o número de pombos por interceptação, tiro ou envenenamento. Porém, vários estudos científicos demonstram que o extermínio, não consegue reduzir o número de aves. O lugar dos pássaros mortos é preenchido dentro de um curto período de tempo por outros novos ou por pássaros que emigram de áreas vizinhas. Esterilizantes químicos, que geralmente são extremamente venenosos, causam a infertilidade temporária ou permanente. Essas substâncias não devem em nenhuma circunstância, serem introduzidas nos ecossistemas urbanos, porque não há garantia de segurança para pessoas ou animais urbanos.<sup>35</sup>

### 2.2.2 Taxonomia

A presente nomenclatura recebeu importantes contribuições nos últimos anos, de Rippon (1988)<sup>36</sup>, Kwon-Chung (1984)<sup>2</sup>, Bennett (1984)<sup>2</sup> e Drouhet (1997)<sup>37</sup>. As leveduras do gênero *Cryptococcus* são classificadas no Reino Fungi, como membros pertencentes à divisão: *Eumycota*; Filo: *Basidiomycota*; Ordem: *Filobasidiales*; Família: *Filobasidiella* e gênero: *Cryptococcus*.<sup>4,23,38</sup>

As espécies são: *Filobasidiella neoformans* variedade *neoformans* (Sorotipo A e D) e *Filobasidiella neoformans* variedade *bacillispora* (Sorotipo B e C) e os respectivos anamorfos são: *Cryptococcus neoformans* (A e D) e *Cryptococcus gattii* (B e C).<sup>27</sup>

### 2.2.3 Sorotipos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Há 5 sorotipos: A, D, AD (*Cryptococcus neoformans*) e B, C (*Cryptococcus gattii*), cujas diferenças residem nas estruturas capsulares de polissacarídeos (antígenos). A classificação das cepas é determinada através de soros absorvidos de coelho, que contêm anticorpos monoclonais específicos para uso em rotina, utilizando o método de aglutinação. Muitos isolados clínicos são sorotipo A o qual encontram-se distribuído de forma ampla, ao contrário do sorotipo D, que ocorre em certos países europeus mas de modo raro quando comparado ao sorotipo anterior.

*C. gattii* por sua vez, também difere pelos sorotipos B e C, de tal forma, que são considerados e reconhecidos como espécie distinta de *C. neoformans* baseando-se em diferenças morfológicas verificadas no basidiósporo, nos nichos ecológicos, nos recursos morfológicos *in vivo* e identidade molecular restrita (55 a 61% parentesco pelo DNA).<sup>21,39</sup>

### 2.2.4 Nicho ecológico de *Cryptococcus neoformans*

Diversos autores apontam os prováveis nichos de *C. neoformans* como: solo, ninhos, ovos, excretas de outras aves evidenciando assim, sua fácil distribuição em zonas urbanas.

Lin & Heitman em 2006, confirmaram a predominância no isolamento de *C. neoformans* em dejetos de aves como pombos. Contudo, as leveduras já foram isoladas também de outras espécies de aves como: galinhas, patos, gansos, águias, pavões, canários, papagaios e periquitos. Evidências confirmam o papel dos pombos como transmissores e/ou reservatórios de *C. neoformans*. São muito raros os estudos sobre *C. neoformans* no interior do corpo dos pássaros. Externamente foram isolados de bicos, penas e pernas dessas aves.<sup>44</sup> Há muito mais positividade referente à *C. neoformans* em fezes secas do que em fezes recentemente emitidas, pelo fato das mesmas encontrarem-se em contato ou com o solo ou com poeira e sujidades.<sup>14</sup> Há evidências de sua existência em poeira domiciliar associada à pacientes infectados por *C. neoformans*.<sup>16,45</sup> Logo, as leveduras podem se multiplicar melhor nos ambientes de solo contaminados por acúmulo de dejetos de aves. Os dejetos secos são substratos mais propícios devido à escassa presença de bactérias, havendo uma menor competição entre elas e *C. neoformans*, promovendo assim uma maior concentração de leveduras. Pombos apresentam uma característica térmica interna de 42° C. As leveduras (*C. neoformans*) não sobrevivem a essa temperatura. Em adição, a microbiota bacteriana isolada do ambiente intestinal de pombos saudáveis, inibe o crescimento de *C. neoformans*, *in vitro*. Os pombos e *C. neoformans* encontram-se disseminados no mundo inteiro e se adaptam com facilidade aos centros urbanos, preservando seu caráter ubíquo.<sup>31</sup>

Fatores ambientais são relevantes possivelmente por interferirem no isolamento das espécies de *C. neoformans*. Estes podem estar relacionados ao clima (umidade, temperatura, evaporação e radiação solar) e com o pH. É importante destacar que *C. neoformans* pode sobreviver à temperatura de 37° C, podendo ser correlacionado ao aspecto de patogenicidade. São considerados raros aqueles capazes de sobreviver em temperaturas maiores. *C. neoformans* é inibido ou não sobrevive à temperatura de 41° C.<sup>46</sup> Essas leveduras em excretas úmidas ou dessecadas de pombos podem se manter vivas por período superior a dois anos.

Até há pouco tempo, acreditava-se que os raios solares inibiam ou destruíam seu crescimento. Porém, sua capacidade de produzir melanina parece lhes permitir não apenas sobreviver aos raios solares como também utilizar as energias do sol para suas próprias atividades metabólicas. A poeira pode transportar pequenas partículas de 1 a 2 micras de diâmetro, capsuladas e atingir os alvéolos pulmonares por inalação.<sup>31,43,47,48,49</sup>

A alta concentração de creatinina nas fezes acumuladas, parece favorecer ainda mais o crescimento de leveduras do gênero *Cryptococcus*, proporcionando consequentemente um ambiente alcalino, hiperosmolar com diversos compostos nitrogenados. As leveduras têm a capacidade de assimilar creatinina, xantina, ureia e ácido úrico, compostos presentes nos dejetos das aves.<sup>31</sup>

### 2.2.5 Pombos: Reservatórios ou Portadores simples

Littman e Borok (1968),<sup>47</sup> consideram pouco provável que o pombo seja principal fonte de leveduras do gênero *Cryptococcus* na natureza, pois sua concentração nestas aves, em regiões como no bico, no estômago, patas e amostras de cloaca nestas aves, é muito baixa. Abou-Gabal e Atia (1978)<sup>50</sup> confirmaram também que não seja seu papel biológico de disseminação na natureza, pois a existência de inúmeras bactérias no intestino, são responsáveis por inibir o seu crescimento, portanto, impedindo assim a multiplicação do fungo.

Quanto ao isolamento de *C. neoformans* em cloacas, ainda há controvérsias. No tubo digestivo das pombas, em 1976, Swinne-Desgáin realizaram estudos sobre a permanência do *C. neoformans* neste sítio anatômico.<sup>51</sup> Entretanto, a temperatura basal dos pombos é suficientemente alta e capaz de impedir a sobrevivência do *C. neoformans* nestes animais. O isolamento de outras espécies do gênero *Cryptococcus* (*C. albidus*, *C. laurentii* e

*C. uniguttulattus*), mais termo- sensíveis do que o *C. neoformans*, poderia ser justificado por uma contaminação exógena. Entretanto, foi observada resistência de algumas cepas no intestino, sugerindo que nem todas elas são tão sensíveis às temperaturas superiores a 37° C. Littman & Borok (1968) <sup>47</sup>, demonstraram a capacidade de sobrevivência no trato gastrointestinal através da recuperação de *C. neoformans* nas excretas frescas. Outros registros, em contraste, demonstraram a capacidade de multiplicação das leveduras não apenas em temperaturas de 41° C e 43° C, como também de sobreviverem alguns dias à 45°C - 46° C. <sup>52</sup>

#### 2.2.6 Mecanismo de transmissão

A disseminação de propágulos infectantes os quais serão depositados nos alvéolos, dependendo do seu tamanho como também interdependente da espessura capsular. <sup>53</sup>

A entrada das leveduras nos alvéolos pulmonares depende do tamanho das mesmas. A sua forma típica vegetativa tem a forma de levedura com o diâmetro de uma célula de 2,5 µm a 10 µm. O organismo pode apresentar reprodução sexuada (*Filobasidiella neoformans*) formando filamentos delicados, basídios e basidiósporos. Porém, a reprodução sexual que geralmente ocorre é assexuada ou vegetativa, formando leveduras. Os basididiósporos (esporos sexuais) possuem de 1,8 a 3 µm de diâmetro e resultam do cruzamento dos tipos **α** e tipo **a** em um meio apropriado. <sup>54</sup>

#### 2.2.7 Ciclo de vida das leveduras do gênero *Cryptococcus*

O estudo do ciclo de vida de um fungo permite observar alterações ambientais e seus reflexos nas diferenças fenotípicas e genotípicas. Muitos fungos em geral, existem no estado haplóide ou

diplóide (Ascomycetes). Contudo, *C. neoformans* (Basidiomycetes) pode se apresentar haplóide, diplóide ou dicariótico.<sup>47</sup>

No estado haplóide, estes microorganismos encontram-se na forma de levedura, fase assexuada. Apresentam-se como células capsuladas, arredondadas ou ovaladas, sem a presença de hifas ou pseudo-hifas. Dividem-se através de brotamentos múltiplos ou simples, resultando em blastoconídeos aderidos à célula mãe. Em meio de cultura de ágar Sabouraud são isoladas colônias com textura mucóide, aspecto brilhoso, viscosas e úmidas, com tonalidade creme.<sup>12, 55</sup>

Ainda não foi observada a fase sexuada (teleomórfica) na natureza. A demonstração é realizada *in vitro* no laboratório. Nesse caso são conhecidos como *Filobasidiella neoformans* ou *Filobasidiella bacillispora*, correspondendo à fase assexuada (anamorfa) *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, respectivamente.<sup>27, 56</sup>

#### 2.2.8 Fonte de *Cryptococcus neoformans* e “não neoformans” no solo

Até pouco tempo atrás *Cryptococcus albidus* e *C. laurentii*, eram considerados saprófitas. Podem ser encontrados no ar, madeira, solo, excretas de pombos e alimentos como queijo, feijões e vinhos. Atualmente, houve uma mudança desse perfil, pois foram observados vários relatos de infecções provocadas por esses microorganismos, sobretudo em pacientes com AIDS. Foram também encontradas as espécies *C. laurentii* e *C. unigutulatus* colonizando humanos.<sup>57</sup>

### 2.2.9 Sorotipo AD

Em 2006, Lin e Heitman, estudaram a contribuição dos híbridos do gênero *Cryptococcus*.<sup>44</sup> Segundo eles, híbridos AD, possuem o mesmo nicho ecológico que o A e D e são também causadores de criptococose. Sua identificação é simples e utiliza testes sorológicos. A hibridização pode ter reflexos na reprodução das espécies e no surgimento de novos genótipos que podem alterar a virulência e a susceptibilidade às drogas antifúngicas. Estudos com o híbrido AD demonstraram que ele pode ser tão patogênico quanto o sorotipo A. Além disso, algumas cepas AD podem tolerar altas temperaturas, podendo tornar-se mais virulentas na sua patogenia.<sup>52</sup>

## 2.3 EPIDEMIOLOGIA DE *C. neoformans*

### 2.3.1 No mundo

Registros sobre solos como reservatórios naturais de *C. neoformans* dando continuidade aos trabalhos de Emmons, surgiram na África em 1956, através dos estudos de Libero Ajello.<sup>58</sup> A predominância mundial do sorotipo A de *C. neoformans* é significativa. Foi observado *C. neoformans* na Espanha<sup>59</sup> em uma frequência de 61,7%, nos EUA<sup>60</sup> - 85% confirmado posteriormente por Litvintseva et al. (2005)<sup>61</sup>, os quais registraram percentual igual a 83% e na Argentina<sup>62</sup> - 89%.

Estudos de tipificação molecular confirmados por Meyer et al. (1999)<sup>63</sup>, relataram essa predominância estando distribuídos na seguinte forma: tipo VNI, sorotipo A, 78%; tipo VNII, sorotipo A, 18%; tipo VNIII, sorotipo AD, 1%; e tipo VNIV, sorotipo D, com 3%.

Sorotipo A refere-se a *C. neoformans* var. *grubii*. Quatro anos mais tarde, Meyer et al. (2003) <sup>64</sup> realizaram estudos com países ibero americanos e confirmaram o mesmo perfil de predominância, VNI 68,2%, VNII 5,6%, VNIII 4,1%, e VNIV 2%.

Pesquisas foram realizadas na Itália, quando isolaram e identificaram *C. neoformans*, em amostras de fezes de morcegos, pombos, raposas e inclusive amostras do solo. <sup>65</sup> Gokulshankar et al. (2004) <sup>66</sup> na Índia, além do isolamento em fezes de aves comuns, isolaram *C. neoformans* em corvos, com positividade igual a 12%. Na Malásia, Tay et al. (2005) <sup>67</sup>, isolaram *C. neoformans* em todos os dejetos de aves (100%), localizados em zoológicos, *petshops* e áreas públicas.

### 2.3.2 No Brasil

No Brasil, vários estudos foram realizados na região Sudeste. Lazéra et al. (1993) <sup>68</sup>, sugeriram novo nicho ecológico para *Cryptococcus gattii*: dejetos de morcegos de uma residência antiga. Mais tarde, Passoni et al. (1998) <sup>33</sup>, revelaram em pesquisas realizadas no domicílio e peridomicílio, alto índice de *C. neoformans*, os quais foram também recuperados de excretas de aves em cativeiros. Montenegro et al. (2000) <sup>48</sup> isolaram *C. neoformans* (26,3% locais positivos) em amostras de fezes de pombos e fragmentos de árvores, cuja sorotipagem revelou o tipo D. Nesse mesmo ano, na região Nordeste, interessante isolamento foi relatado: *C. neoformans* e *C. gattii* em um único oco de árvore. <sup>41</sup> Em relação ao conjunto de 32 ocos de árvores, foi apontada positividade em apenas 6 (18,5%). Já na região Centro-Oeste, na cidade de Campo Grande – MS, 20 amostras de excretas de aves em cativeiros foram avaliadas. *C. neoformans* foi isolado a partir das seguintes aves: canário belga e mandarim, periquito-australiano e mandarim, agapore e pombo rabo de leque. <sup>42</sup> Na região Sul foram

isolados *C. neoformans*, em 88 amostras de fezes de pombos, provenientes de diferentes praças da cidade de Porto Alegre.<sup>69</sup> Na região Sul, os estudos se concentraram na cidade de Curitiba<sup>70</sup>, e foram avaliadas amostras de psitacídeos cativos, além de isolados clínicos, cuja positividade foi respectivamente igual a 24,1% e 1,4%, para passeriformes e psitacídeos cujo tipo molecular foi identificado como VNI. Na região Nordeste, na cidade de Fortaleza<sup>71</sup>, estudos foram realizados em dejetos de pombos (n= 47) e cloacas (n= 322) possibilitando apenas dos primeiros o isolamento de *Cryptococcus laurentii* além de *C. neoformans*.

### 2.3.3 Região Centro Oeste

Fernandes et al. (2000)<sup>72</sup> estudaram pacientes (n= 50) com criptococose meningoencefálica associada à AIDS em Goiânia - GO. Foram identificados *C. neoformans* - (94%) e *C. neoformans gattii* - (6%), provenientes em sua maioria da cidade de Goiânia. A predominância de *C. neoformans* em pacientes com AIDS deveu-se provavelmente à maior exposição dos indivíduos ao habitat natural deste fungo.

Muitos trabalhos associam *C. neoformans* também à excretas de pombos e outras aves e *C. gattii* às árvores de eucaliptos. No entanto tem sido observada a presença também do *C. neoformans* nesses eucaliptos bem como em ocos de diferentes árvores. Portanto não existe ainda uma associação definida entre o fungo e um tipo específico de habitat.<sup>73,74,75</sup>

Lindenberg et al. (2008)<sup>76</sup>, fizeram um estudo do perfil clínico e epidemiológico de 123 pacientes no ano de 2005 com criptococose em Campo Grande - MS. Dentre o total de pacientes, 84,5% eram HIV positivos, 4,9% apresentavam doença de base e 10,5% eram imunocompetentes. A maioria foi identificada como *C. neoformans* (89,6%) e *C. gattii* correspondeu à 10,4%. A maioria também era natural ou procedente do estado de Mato

Grosso do Sul (73,2%). O índice de letalidade foi igual a 49,6%, sendo que os pacientes HIV positivos totalizaram 51%.

Souza et al. (2009) <sup>20</sup>, estudaram 84 amostras clínicas de liquor provenientes de pacientes com AIDS e 40 isolados ambientais de excretas de pombos e de árvores (eucaliptos). Foram identificados em 120 isolados, *C. neoformans* var *grubii* (sorotipo A) e em 4 isolados *Cryptococcus gattii* (sorotipo B). A atividade da enzima fosfolipase em amostras clínicas foi maior do que nos isolados ambientais. Os testes de susceptibilidade *in vitro* exibiram resultados similares para anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol, sem detecção de resistência. Foi identificado o tipo molecular VNI em 80 amostras clínicas e 40 amostras ambientais, e o tipo molecular VGIII foi identificado em 4 isolados clínicos. Este foi o primeiro estudo molecular abrangendo isolados clínicos e ambientais das leveduras do gênero *Cryptococcus* provenientes da região Centro Oeste.

O primeiro estudo realizado em Mato Grosso <sup>77</sup> abordando caracterização fenotípica de amostras clínicas positivas para *Cryptococcus* spp foi realizada em 2009. Foram isoladas 37 leveduras de 26 pacientes HIV positivos (25 *C. neoformans* e 1 *C. gattii*) e 10 de HIV-negativos (5 *C. neoformans* e 5 *C. gattii*).

## 2.4. CRIPTOCOCOSE

Segundo Wanke et al. (2000) <sup>78</sup>, de modo geral as infecções fúngicas, podem ser classificadas sob o ponto de vista da sua porta de entrada. Porém neste caso, infecções sistêmicas são referidas a hospedeiros imunocompetentes. No caso de ocorrer em indivíduos com baixa imunidade ou imunocomprometidos a classificação mais adequada da infecção seria oportunista, uma vez que é decorrente de uma doença de base ou do uso de imunossupressores. Portanto, embora o *Cryptococcus gattii* cause uma micose sistêmica, ele pode também causar uma infecção oportunista em imunossuprimidos.

As micoses podem ser avaliadas considerando-se dois aspectos: o estado imunológico do hospedeiro e a exposição ambiental. Quando ocorre uma alteração no equilíbrio entre esses fatores, pode ocorrer a instalação da doença criptococose.<sup>27</sup> Por outro lado, a sobrevivência do fungo vincula-se à termotolerância no corpo humano, pois muitos fungos são incapazes de crescer a 37° C.<sup>79</sup>

É interessante observar o conceito de reservatório em hospedeiro humano, o qual pode se apresentar assintomático, mesmo contendo o microorganismo patogênico, servindo portanto como hospedeiro passivo. Há colonização de *C. neoformans* em orofaringe, pele, narinas e escarro. Além disso, pode se tornar dependendo das condições imunes do indivíduo que o alberga o futuro sítio de infecção, de onde se dissemina para o organismo.<sup>33</sup>

Randhawa e Paliwal (1979)<sup>80</sup> reportaram que o isolamento de *C. neoformans* é muito baixo em culturas de escarro. No entanto, a semeadura de escarro de paciente com tuberculose pulmonar revelou aproximadamente 300 colônias de *C. neoformans*. Este achado sugere que o escarro e o trato respiratório superior, possam ser considerados ótimos substratos para a sobrevivência e multiplicação dos fungos. Quanto à frequência da exposição em humanos parece ser comum e podem ser isolados em numerosos locais: edifícios velhos, igrejas, jardins zoológicos, celeiros, estábulos e domicílios domésticos.<sup>33</sup>

#### 2.4.1 Criptococose e AIDS

A criptococose é considerada em vários países, “marcador” para processos imunossupressivos.<sup>81</sup>

A meningite criptocócica é uma das mais importantes infecções. Nos países com alta prevalência de HIV/AIDS, a criptococose é uma das mais frequentes causas de meningites em geral, ultrapassando as causadas pelas bactérias como *Streptococcus pneumoniae* ou *Neisseria meningitidis*. Com a introdução da terapia antirretroviral, a incidência declinou significativamente na América do Norte e no oeste europeu. O número de infecções por meningite criptocócica é semelhante às outras doenças que receberam atenção da saúde pública. Na África sub-Saara, os óbitos por meningite criptocócica superam os óbitos por tuberculose.<sup>82</sup>

A infecção pelo vírus emergente do HIV, com consequente epidemia de AIDS, tem sido responsável pelo aumento de infecções oportunistas, causadas pelas leveduras *C. neoformans*, segunda causa de infecção mais importante em pacientes com AIDS. A prevalência de criptococose varia de 3 a 6 % na Europa, 6-10% nos EUA e 10-30% em alguns países tropicais, especialmente África Central. No Brasil, a prevalência é aproximadamente de 5 a 10% e, quase todos os casos são atribuídos à *C. neoformans*.<sup>79,83,84</sup>

#### 2.4.2 *Cryptococcus neoformans*

*C. neoformans* tem ampla distribuição mundial sendo frequentemente associado com o solo contaminado por fezes de pássaros, especialmente os pombos (*Columba livia*). Muitos estudos epidemiológicos avaliavam apenas *C. neoformans*, não considerando outras espécies como: *C. laurentii*, *C. albidus* ou *C. uniguttulatus*.<sup>81</sup> Contudo, essas espécies consideradas saprófitas, nas últimas décadas tiveram um aumento significativo de relatos, como causa de infecções, em especial *C. albidus* e *C. laurentii*. Essas duas espécies perfazem 80% dos casos relatados de criptococose não-*neoformans* e não-*gattii*.<sup>57,85</sup>

Estudos realizados no Brasil <sup>68</sup> e na África <sup>45</sup> revelaram que os pacientes com AIDS podem estar mais frequentemente expostos à levedura em suas próprias moradias. Portanto, o desenvolvimento de estudos quantos aos prováveis nichos ecológicos tem sido intensificados nos últimos anos, particularmente no Brasil. É interessante observar que até o momento não foi encontrada associação entre fezes de pombos e *C. gattii*. <sup>86,87</sup> Esta espécie foi recentemente isolada de outras aves na região sul do Brasil. <sup>88</sup>

## 2.5. FATORES DE VIRULÊNCIA

Patogenicidade pode ser caracterizada como a capacidade do microorganismo em causar danos ao hospedeiro. Existem estruturas que atuam como fatores de virulência, sendo a cápsula classicamente caracterizada como um destes, associados à resposta antigênica. <sup>89</sup>

Steenberger & Casadeval (2003) <sup>90</sup>, elencam como fatores de virulência para leveduras do gênero *Cryptococcus*: cápsula polissacarídica, lacase e melanina, fosfolipase, urease, proteinase, *mating type* e crescimento a 37° C.

### 2.5.1 – Cápsula polissacarídica

A cápsula expressa pelo fungo basidiomiceto *Cryptococcus neoformans* é composta por galactoxilomana (GalXM), glicuroxilomana (GXM) e pequenas quantidades de manoproteínas. GalXM e GXM induzem grupos de citocinas, e a GalXM induz a apoptose de macrófagos por alterações morfológicas. <sup>91</sup>

Os antígenos da cápsula são importantes pois permitem a especificidade dos sorotipos da GXM. A GXM depende de características e ligações químicas resultantes da interação entre a manose e xilose. É importante considerar que mesmo sendo importante fator de

virulência, ela por si só não é um fator exclusivo, visto que cepas mutantes acapsulares ou com tamanho reduzido de cápsula podem causar a infecção da mesma forma.<sup>90</sup>

Quanto à função da cápsula, primeiro temos a questão da sobrevivência no meio ambiente, seguida da proteção contra dessecação e formação de biofilmes. Nas células do hospedeiro, ela tem um papel antifagocítico importante dentro das células e de plasticidade morfológica entre lisa e mucóide, elevando a sobrevivência em macrófagos.<sup>92</sup>

### 2.5.2 – Lacase e melanina

A enzima lacase (fenol oxidase) produz melanina através de auto polimerização, em meios contendo difenóis. A melanina é produzida através da PKA (proteína quinase A) e se deposita no interior da parede da levedura, tem a característica da insolubilidade e da resistência a substâncias químicas e enzimas.

Estudos com diferentes meios de cultura para evidenciar melanina foram realizados como: ágar sementes de girassol (*Helianthus annuus*), ágar niger (*Guizotia abyssinica*), ágar batata, ágar cenoura e ágar pimenta.<sup>93</sup>

### 2.5.3 - Fosfolipase

As fosfolipases são grupos de enzimas heterogêneas que hidrolisam ligações ésteres em glicerofosfolípidos. Possuem a função de liberação de lipídeos tais como inositol, trifosfato e ácido aracídico. Atuam nas membranas das células desestabilizando-as e lisando-as.<sup>94,95</sup>

A atividade extracelular da fosfolipase como fator de virulência foi estudada por Cox et al. (2001)<sup>96</sup>, através da construção de clones da enzima PLB1 e de sua mutante. Estes autores demonstraram *in vivo* em ratos e coelhos a meningite criptocócica.

#### 2.5.4 - Urease

A enzima urease hidrolisa a uréia para amônia e carbamato e em condições fisiológicas resulta em aumento do pH.<sup>97</sup> O aumento do pH produzido pelo hidróxido de amônia produz injúria tecidual e permite a sobrevivência da levedura.<sup>98</sup> É utilizada como uma ferramenta de identificação de *C. neoformans*.<sup>99,100</sup> No entanto, há registro de um caso urease negativo em um paciente imunocompetente. Não se conhece o mecanismo de patogenicidade da enzima, nem tampouco o respectivo papel da mesma. Postula-se seu papel como fonte de nitrogênio nesse nicho ecológico. Tem sido sugerido que a urease possa promover o sequestro do microorganismo nos microcapilares antes da disseminação no cérebro e correlaciona-se com uma diminuição significativa das células de defesa nos pulmões de ratos.<sup>101,102</sup>

#### 2.5.5 - Proteinases

O papel das proteinases de fungos, bactérias e anaeróbios tem sido estabelecido na patogênese. Elas contribuem na virulência microbiana, através da destruição de tecidos do hospedeiro e digestão de proteínas imunologicamente importantes como imunoglobulinas e complementos.<sup>103,104,105</sup> Em 1996, Chen et al. confirmaram a atividade em *C. neoformans*, através da hidrólise da azoalbumina, liquefação da gelatina e eletroforese do substrato proteico associado com a levedura.<sup>106</sup>

#### 2.5.6 - Mating types

Ocorrem dois tipos de *mating*, o **a** e o **α**. Existe um viés para o *mating type α*, tal como ser de 30-40 vezes mais prevalente do que o *mating a*, tanto em amostras ambientais como em amostras clínicas. Quando cepas isogênicas eram utilizadas, variando apenas o *mating*, em ratos, observou-se que o *mating type α* era muito mais virulento do que o *mating a*.<sup>23</sup>

### 2.5.7 - Crescimento a 37° C

Para permitir sua sobrevivência é essencial a capacidade de resistir à temperatura fisiológica. Há muito mais que 20.000 espécies de fungos, no entanto, apenas poucos estão aptos para causar doenças (inferior a 0,01%) justamente por essa sensibilidade à temperatura de 37° C.<sup>90</sup>

## 2.6. PATOGENIA

As manifestações clínicas de infecções causadas por *C. neoformans* e *C. gattii* são muito semelhantes.

A criptococose inicia-se por inalação e infecção por micropropágulos através da sua exposição ambiental (leveduras ou esporos de 1 a 2 um de diâmetro), podendo assim se disseminar para os pulmões e depois para o SNC onde é potencialmente fatal.<sup>107</sup> Nos primeiros órgãos promove uma colonização assintomática (maioria dos casos) ou a infecção pode ser evidenciada por exames de radiografia (nódulos pulmonares sub-pleurais únicos ou múltiplos) associados a sinais clínicos como febre, dor no peito, perda de peso, tosse produtiva. Em alguns pacientes a pneumonia criptocócica evolui rapidamente para sintomas meníngeos pela disseminação extra pulmonar ao SNC (imunocomprometidos) ou permanece limitada ao quadro isolado de criptococose pulmonar (imunocompetentes). Pacientes com AIDS apresentam pneumonia criptocócica como sintoma primário e mais de 90% exibem infecção concomitante do SNC.<sup>39</sup> O tipo pulmonar é a segunda doença mais frequentemente diagnosticada depois da meningoencefalite e a segunda causa de nódulo pulmonar em pacientes transplantados de fígado, após a aspergilose.<sup>108</sup> Em pacientes sintomáticos, podem ser observados os seguintes sintomas: febre (26%) em alguns, tosse (54%) na maioria, com

expectoração mucóide com ou sem hemoptise (18%). Nos pacientes com AIDS, o comprometimento pulmonar é de 30% aproximadamente.<sup>109</sup> Sendo rara a criptococose pulmonar em imunocompetentes, é frequentemente indicado o exame histopatológico através de biópsia do pulmão para diagnóstico específico da doença.<sup>110</sup>

Os pacientes podem não apresentar quadros de cefaleia, ou ainda apresentar cefaleias intermitentes. Em 76% dos pacientes são registradas cefaleias continuadas com alterações mentais. Febre pode estar presente em 65% dos acometidos.<sup>39, 111</sup> A meningoencefalite (80%) é forma mais diagnosticada, isolada ou associada ao acometimento pulmonar.<sup>112, 113</sup> Pode ser classificada em meningoencefalite aguda ou subaguda, com lesões focais únicas ou múltiplas no SNC. Em caso de *C. gattii*, pode simular neoplasias associadas ou não ao quadro meníngeo no hospedeiro imunocompetente. Em imunodeprimidos, ocorre a forma disseminada com meningoencefalite, em pacientes em geral masculinos onde normalmente a carga fúngica é elevada e há predomínio do *C. neoformans* sorotipo A. Os sinais clínicos podem variar desde ausência dos mesmos à meningoencefalite aguda ou sub aguda.<sup>46</sup> Hemoculturas positivas (fungemias) são frequentes em 25% dos casos. Em pacientes com AIDS, alguns sinais servem como sinal de alerta para suspeita de meningite criptocócica: cefaléia, febre de origem desconhecida, demência progressiva e confusão mental. Uma quantidade de linfócitos T CD4+ inferior a 50 células, poderia explicar a dificuldade de erradicar leveduras do gênero *Cryptococcus* do SNC e do LCR. As sequelas podem ser caracterizadas pela diminuição da capacidade mental (30%), da acuidade visual (8%), paralisia permanente de nervos cranianos (5%) e hidrocefalia.<sup>111</sup>

O comprometimento cutâneo ocorre em aproximadamente 10-15% dos casos de criptococose e representa um marcador de disseminação da criptococose. As lesões ocorrem em geral por disseminação hematogênica (Criptococose Cutânea Secundária - CCS), no entanto, a criptococose primária cutânea (CCP) pode ocorrer por rara inoculação direta do

microorganismo na pele.<sup>17,114,115</sup> Devido à baixa penetração de antifúngicos nesse local poderia servir como justificativa da persistência do fungo.<sup>111</sup>

Infecções oculares podem ocorrer concomitantemente a infecções por outros vírus como CMV e HIV. O envolvimento ocular ocorre em geral antes do diagnóstico da meningoencefalite.<sup>46</sup>

A criptococose pode ocorrer em outros sítios anatômicos causando doenças nos ossos, articulações e peritonite.<sup>39</sup>

## 2.7. CRIPTOCOCOSE E A BIOLOGIA MOLECULAR

A técnica de hibridização desenvolvida em 1975 para estudo de diversos microorganismos patogênicos foi o primeiro exame molecular usado para identificar o *C. neoformans*, baseado no reconhecimento de sequências específicas de bases.<sup>116,117</sup> Em 1992, Varma realizou a identificação do *C. neoformans*, através do gene URA5, o qual permitiu hibridizar de 12 a 14 cromossomos do fungo.<sup>118</sup>

Através da técnica da PCR, houve a possibilidade de amplificação de pequenos e específicos segmentos do genoma, permitindo a obtenção *in vitro* de múltiplas cópias de região específica do DNA.<sup>119,120</sup> Possui a vantagem de ser mais rápida, fácil e econômica em relação à hibridização e de ter alta sensibilidade e especificidade. As alternativas técnicas derivadas da PCR como Nested PCR, multiplex PCR e Real Time PCR foram utilizadas e obtiveram sucesso para a identificação de *C. neoformans* e *C. gattii*.<sup>120,121,122</sup>

Contudo, é necessário que os métodos de genotipagem tenham a propriedade da reprodutibilidade. Isso fez com que se desenvolvessem as técnicas de PCR fingerprinting, RAPD, PCR-RFLP, AFLP e MLST<sup>64,123,124,125,126</sup> hoje empregadas para caracterização genotípica de leveduras do gênero *Cryptococcus*.

Associada a outras técnicas, a PCR fingerprinting possibilitou a classificação dos isolados clínicos e ambientais dentro de 8 tipos moleculares de sequências específicas e reprodutíveis sendo quatro identificados em *C. neoformans* como: VNI (sorotipo A1), VNII (sorotipo A2), VNIII ( sorotipo AD), VNIV (sorotipo D), e quatro identificados em *C. gattii* VGI, VG II, VGIII e VGIV. Ainda não é bem exata a correlação entre sorotipos e tipos moleculares para *C. gattii*.<sup>44,127</sup> A técnica foi muito importante para a compreensão da epidemiologia do tipo molecular de *C. gattii*, observando-se uma cepa extremamente virulenta, o tipo molecular VGII.<sup>128</sup> Alguns estudos buscam determinar se há relação entre características clínicas e, susceptibilidade aos antifúngicos e o tipo molecular envolvido na infecção.<sup>123</sup> A PCR-RFLP (Restriction Length Polymorphism) e AFLP (Amplified Fragment length Polymorphism), são técnicas rápidas para detecção dos sorotipos e tipos moleculares do complexo *C. neoformans*.<sup>129,130</sup> A PCR-RFLP não necessita de prévia hibridização, é realizada a partir da utilização de *primers* específicos e depois de submetidos à PCR são clivados por enzimas de restrição.<sup>131</sup> Apresentam algumas desvantagens como por exemplo múltiplas fases envolvidas no procedimento.<sup>132,133</sup>

O AFLP agrupou o complexo *C. neoformans* em 6 tipos moleculares: AFLP1, AFLP2, AFLP3, AFLP4, AFLP5, AFLP6 (BOEKHOUT *et al* 2001). Não há ainda definição quanto ao sorotipo híbrido AD e o AFLP correspondente.<sup>121,124</sup>

### 2.7.1 Contribuições das técnicas na criptococose

A biologia molecular veio auxiliar o diagnóstico da criptococose com maior precisão e rapidez que se exige para diferenciar complexos quadros clínicos da doença. Houve um avanço no conhecimento da epidemiologia das micoses através de análises definidas das regiões do genoma do fungo, presente nas amostras clínicas.<sup>134</sup>

O diagnóstico da criptococose tem sido baseado no exame direto e isolamento, seguido de identificação bioquímica e imunodiagnóstico. Contudo esses testes ainda podem apresentar limitações podendo ser complementados por técnicas moleculares.<sup>135</sup>

Testes fenotípicos podem ser trabalhosos e muitas vezes apresentam imprecisão pela subjetividade de interpretação dos resultados.<sup>134</sup> Testes automatizados e semi automatizados como API 20C AUX e VITEK, oferecem resultados em 72 horas aproximadamente. Contudo, esses testes possuem limitações quando há a necessidade de outros complementares para conclusão da identificação do isolado.<sup>136,137</sup>

Em se tratando de diagnóstico utilizando métodos imunológicos, podem ocorrer resultados falso positivos considerando reação cruzada com fatores reumatóides, *Trichosporon* spp e contaminação por bactérias Gram negativas. Porém, o teste de látex com anticorpos utilizado na pesquisa de antígenos capsulares exibe grande eficiência em líquido.<sup>135</sup>

Atualmente existem métodos moleculares, ainda não utilizados rotineiramente em laboratórios clínicos, que detectam uma determinada sequência específica do gene do gênero *C. neoformans*, tanto de amostras clínicas quanto de culturas<sup>138,139</sup> Portanto, ferramentas moleculares oferecem alta sensibilidade e especificidade e podem ser muito utilizadas em estudos epidemiológicos e de tipagem.<sup>140,141</sup>

## 3.Objetivos

### **3.1 Objetivo Geral:**

Isolar e identificar *C. neoformans* em excretas de pombos coletados em distintos locais nos municípios de Cuiabá e Várzea Grande.

### **3.2 Objetivos Específicos:**

- 1- Isolar *C. neoformans* a partir de excretas de pombos em distintos locais (praças públicas, igrejas, instituições de ensino, unidades básicas de saúde, residenciais, fábrica e presídio) nos municípios de Cuiabá e Várzea Grande
- 2- Caracterizar fenotipicamente através de técnicas bioquímicas (urease e CGB) os isolados ambientais de *C. neoformans*
- 3- Confirmar a identidade genotípica dos isolados caracterizados anteriormente (item 2) através da técnica de PCR

## 4. Métodos

### 4.1 Tipo de Estudo:

Descritivo

### 4.2 Amostragem:

A amostragem foi constituída por excretas de pombos, as quais foram coletadas nos municípios de Cuiabá e Várzea Grande.

### 4.3 Períodos e locais selecionados para a coleta das amostras

#### 4.3.1 Períodos

As amostras foram coletadas em dois períodos distintos: I e II. Cada período foi constituído por 3 meses correspondendo a: I (julho, agosto e setembro) e II (outubro, novembro e dezembro) no ano de 2010.

O número total de amostras correspondeu a 122; estas foram obtidas em 49 locais distribuídos da seguinte forma: praças públicas (n=5), igrejas (n=4), instituições de ensino (n=3), unidades de saúde (n=8), áreas abertas exibindo cobertura de amianto (n=4), conjuntos residenciais domiciliares (n=23), fábrica (n=1), presídio (n=1).

#### 4.3.2 Locais

Foram selecionados locais distintos com a presença de pombos (*Columba livia*) e concomitantemente, depósito ou acúmulo de seus dejetos nos municípios de Cuiabá e Várzea Grande. Estes locais foram subdivididos em oito grupos. São eles:

Grupo I – Praças

Grupo II – Igrejas

Grupo III – Escolas

Grupo IV – Instituições de saúde

Grupo V – Áreas abertas (com cobertura em amianto)

Grupo VI – Residenciais

Grupo VII – Fábrica

Grupo VIII – Presídio

#### **4.3.2.1 - Grupo I (Praças)**

- 1- Praça Alencastro
- 2- Praça Ipiranga
- 3- Praça Santos Dumont
- 4- Praça da República
- 5- Praça Rachid Jaudy

#### **4.3.2.2 - Grupo II (Igrejas)**

- 1- Igreja Mãe dos Homens
- 2- Igreja Nossa Senhora do Bom Despacho
- 3- Basílica do Senhor Bom Jesus – Catedral
- 4- Capela São Mateus

#### **4.3.2.3 - Grupo III (Universidades/Escolas)**

- 1- Universidade de Cuiabá - UNIC
- 2- Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT
- 3- Escola Cooperar - Cooperativa Educacional dos Servidores da Escola Técnica Federal de Mato Grosso.

**4.3.2.4 - Grupo IV (Unidades de saúde)**

- 1- Hospital Geral Universitário - HGU
- 2- MT Laboratório – LACEN-MT
- 3- Centro Estadual de Referência de Média e Alta Complexidade - CERMAC
- 4- Hemocentro
- 5- Central de Especialidades Médicas
- 6- Regional do Ministério da Saúde
- 7- Laboratório Municipal de Várzea Grande
- 8- Posto de Saúde – Bairro: CPA IV

**4.3.2.5 - Grupo V (áreas abertas com cobertura de amianto)**

- 1- Arquivo Central da Polícia Civil- Bairro: CPA III
- 2- Ginásio de Esportes – Bairro: CPA III
- 3- Terminal Rodoviário de Várzea Grande
- 4- Ginásio de Esportes do SESC Unidade Porto

**4.3.2.6 - Grupo VI (residenciais)**

- 1- Residência no bairro Santa Amália
- 2- Residência no bairro Bosque da Saúde
- 3- Residência no bairro Jardim Califórnia
- 4- Prédio residencial Santa Inês Bloco 21
- 5- Prédio residencial Santa Inês Bloco 34
- 6- Prédio residencial Santa Inês Bloco 34
- 7- Prédio residencial Santa Inês Bloco 55
- 8- Prédio residencial Santa Inês Bloco J
- 9- Prédio residencial Gênesis (Bairro Popular)
- 10- Residência no bairro Jardim Kennedy
- 11- Residência no bairro Santa Rosa
- 12- Residência no bairro Nova Várzea Grande
- 13- Prédio residencial São Carlos Bloco 4
- 14- Prédio residencial São Carlos Bloco 7

- 15- Prédio residencial São Carlos Bloco 32
- 16- Prédio residencial São Carlos Bloco 2
- 17- Residência no bairro Bela Vista
- 18- Prédio residencial Paiaguás Bloco1 Quadra 10
- 19- Prédio residencial Paiaguás Bloco 2 Q 10
- 20- Prédio residencial Paiaguás Bloco 3 Q 10
- 21- Prédio residencial Paiaguás Bloco 4 Q 10
- 22- Ana Eugennia Buffet de Festas (Bairro Lixeira)
- 23- Edifício Boa Esperança (Centro)

#### **4.3.2.7 - Grupo VII (fábrica)**

Fábrica Nutrideal – Bairro Cidade Verde

#### **4.3.2.8 - Grupo VIII (presídio)**

Centro de ressocialização de Cuiabá (Presídio do Planalto).



**Figura 01:** Praça Santos Dumont apresentando grande quantidade de pombos

**Fonte:** Imagem obtida pela autora



**Figura 02:** Praça Rachid Jaudy, apresentando bancos com depósito de excretas em grande quantidade.

**Fonte:** Imagem obtida pela autora



**Figura 03:** Igreja Nossa Senhora do Bom Despacho

**Fonte:** Imagem obtida pela autora



**Figura 04:** Instituição de ensino – Universidade de Cuiabá

Fonte: Imagem: obtida pela autora



**Figura 05:** Instituição de Saúde – Posto de Saúde do Bairro CPA II

Fonte: Imagem cedida por Hugo Hoffmann



**Figura 06:** Presídio – Centro de Ressocialização de Cuiabá (Bairro Planalto)

Fonte: Imagem cedida por Diniz Pereira Leite Junior

#### 4.4 Critérios de inclusão

Em todos os locais selecionados foram avaliados os aspectos referentes aos dejetos coletados, obedecendo os seguintes parâmetros: excretas apresentando aspecto ressecado depositadas nas superfícies de ambientes públicos ou domiciliares; presença de pombos próximos às excretas; presença de filhotes ou ninhos; quantidade suficiente para posterior pesagem ( $> 1$  grama).

#### 4.5 Critérios de exclusão

Amostras em diminutas quantidades ( $<1$  grama) e aquelas encontradas em locais públicos não associadas à presença de pombos.

#### 4.6 Local de estudo

As análises laboratoriais foram realizadas nas dependências do Laboratório de Investigação (Laboratório de Micologia), pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso (LI/PPGCS/FM/UFMT), e nos Laboratórios de Biologia Molecular Veterinária e de Microbiologia Veterinária, da Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEV/UFMT).

#### 4.7 Processamento das amostras:

As amostras foram pesadas em balança analítica (Gehaka AG2000) em quantidade igual a 1 grama. Em seguida, as excretas foram maceradas em gral de porcelana previamente esterilizado. O produto macerado foi transferido para erlenmeyer estéril contendo 50mL de solução salina estéril acrescida de 0,4 g/L de cloranfenicol. Foi utilizado o sistema de vedação do erlenmeyer com parafilme objetivando agitação da mistura, a qual foi procedida em tempo igual à 5 minutos. A suspensão obtida permaneceu em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente.

Foi aspirado a partir do sobrenadante, volume igual a 0,1 mL para semeadura com alça de Drigalski em placas de pétri contendo meio de NSA (ágar Niger – *Guizotia abyssinica*), acrescido de

0,2 g/L de cloranfenicol. Para cada amostra processada, foram semeadas 10 placas contendo NSA, incubadas à 27° C em estufa DBO (Eletrolab) por um período de 5 dias.

Paralelamente, colônias de leveduras não pigmentadas, exibindo consistência cremosa e aspecto brilhante, foram repicadas em ágar Sabouraud. A partir do re-isolamento das colônias leveduriformes em ágar Sabouraud foi realizado o teste da ureia. Os isolados ambientais considerados ureia positivos e fenol oxidase positivos foram presuntivamente identificados como leveduras do gênero *Cryptococcus*.



**Figura 7** - Amostras de dejetos de pombos em coletores - LI-FM /UFMT  
Fonte: Imagem obtida pela autora



**Figura 8** - Pesagem das Amostras - LI-FM /UFMT  
Fonte: Imagem cedida por Rosane Christine Hahn



**Figura 9** - Dejetos pesados – LI-FM/UFMT  
Fonte: Imagem obtida pela autora



**Figura 10** - Transferência para o gral de porcelana LI-FM/ UFMT  
Fonte: Imagem obtida pela autora



**Figura 11** - Trituração – LI-FM/UFMT  
Fonte: Imagem cedida por Walquirya B Simi



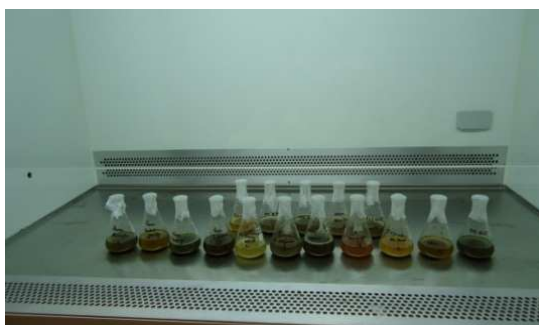
**Figura 12** – Transferência para o erlenmeyer – LI-FM/UFMT  
Fonte: Imagem cedida por Walquirya Borges Simi



**Figura 13-** Sol. fisiológica 0,9% com cloranfenicol 0,4% LI-FM/UFMT  
Fonte: Imagem cedida por Walquirya Borges Simi



**Figura 14-** Procedimento de agitação –LI-FM/UFMT  
Fonte: Imagem cedida por Walquirya Borges Simi



**Figura 15-** Suspensão de amostras em repouso LI-FM/UFMT  
Fonte: Imagem obtida pela autora



**Figura 16 -** Transferência de 0,1 mL por placa de ágar niger LI-FM/UFMT  
Fonte: Imagem cedida por Walquirya Borges Simi



**Figura 17-** Semeadura com alça de drigalski LI-FM/UFMT  
Fonte: Imagem cedida por Walquirya Borges Simi



**Figura 18-** Placas de niger semeadas- LI-FM/UFMT  
Fonte: Imagem obtida pela autora

#### 4.7.1 Cultura e identificação

Colônias exibindo aspecto macroscópico compatível com leveduras do gênero *Cryptococcus* foram identificadas e semeadas em ágar niger (NSA) como forma de triagem, confirmação da pureza das colônias e obtenção de subcultivos (27° C) em meio de ágar Sabouraud dextrose 2% para realização das provas de identificação.

Em ágar niger, estas colônias exibiram consistência cremosa, coloração marrom escura, textura lisa e aspecto brilhante.

#### 4.7.2 Teste da Urease

Colônias de leveduras foram repicadas em ágar Sabouraud e incubadas por 48 horas em estufa DBO (Eletrolab) à 27° C. Após esse tempo, com o auxílio de uma alça de sementeira, foi transferido um inóculo pesado da colônia repicada para o tubo contendo o meio de ureia. Após agitação do tubo para homogeneização foi realizada a incubação em estufa DBO 27° C por um período de 3 a 7 dias. O teste foi considerado positivo quando a cor do meio foi modificada para rósea. Após a ausência de alteração da cor considerou-se como teste negativo.

#### 4.7.3 Identificação fenotípica em meio CGB (Canavanina Glicina Azul de Bromotimol)

Para diferenciar as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* foi utilizado o meio CGB. Este teste é baseado em dois parâmetros metabólicos observados em isolados de *C. gattii*: assimila a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio e resistente à canavanina. O teste positivo é observado quando a coloração amarela-esverdeada do meio torna-se azul-cobalto, como resultado da alcalinização do meio pela da amônia liberada durante a degradação da glicina, enquanto que *C. neoformans* não demonstra mudança na coloração do meio, por não usar essa via metabólica.<sup>142</sup>

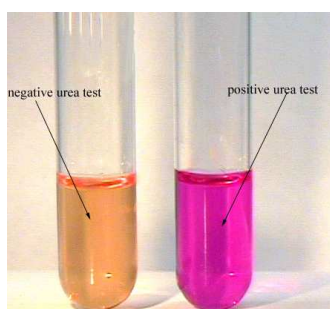


Figura 19: Teste da ureia

Fonte: <http://www.mesacc.edu/~johnson/labtools/Dbiochem/urea.html>



Figura20:

Meio de CGB  
(Canavanina-  
glicina-azul de

Fonte:

<http://www.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.scielo.br/img/revistas/rsbmt/v41n5/a22fig01.jpg&imgrefurl=http://www.scielo.br/scielo.php>



Figura 21:

Meio de NSA

Fonte: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/crypto5.gif>

#### 4.7.4 Teste confirmatório pela PCR (Polymerase Chain Reaction)

##### 4.7.4.1 Extração de DNA genômico

Para extração de DNA foi utilizado o protocolo descrito por POETA et al. (1999) <sup>142</sup> com algumas modificações. Alçadas do cultivo foram transferidas para um microtubo de 2 mL, contendo 1 mL de tampão de lise (100 mM NaCl; 10 mM TRIS pH 8.0; EDTA 0,5 mM pH 8,0, SDS 0,5%) e 0,05 gramas de pérolas de vidro. Os tubos foram inicialmente agitados em vórtex por 5 minutos, seguido de fervura a 100°C por 5 minutos e posteriormente centrifugados a 16000 g/ 5 min. O sobrenadante foi coletado e adicionado de 1 volume de fenol-clorofórmio. O DNA foi coletado por centrifugação a 16000 X g por 15 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga (1,5 mL) e adicionou-se NaCl 0,2M e 1 volume de isopropanol gelado e incubado overnight a - 20° C para precipitação. O DNA foi coletado por centrifugação a 16.000 g/ 5 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 1mL de etanol 70% gelado e ressuspenso em 50 µl de água MilliQ. Posteriormente o DNA foi tratado com RNase A por 1 hora à 37°C. A qualidade e integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel agarose 1,0% à 100 V por cm, com o auxílio do transiluminador (Loccus).

##### 4.7.4.2 Realização da técnica de PCR para *Cryptococcus neoformans* .

Para determinar a espécie dos isolados foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores CNA70A (5'- ATTGCGTCCATGTTACGTGGC-3') e CNA70S (5' ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC-3'), específicos para *C. neoformans* que originam produtos de 695 pb. <sup>144,145</sup> A PCR foi conduzida em um volume final de 25 µl. Cada reação conteve 20

ng de DNA, solução tampão para PCR 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM), 200 µM de cada dNTP, 3 mM de cloreto de magnésio, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 25 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador. A PCR foi realizada em 28 ciclos em um termociclador (Thermo2 – PXE 0,2), com desnaturação inicial por 10 min à 94°C, 1 min para desnaturação à 94°C, 1 min de anelamento à 56°C e 2 min de extensão à 72°C, seguidos por um ciclo de extensão final por 10 min à 72°C. Os produtos de amplificação foram analisados em eletroforese em gel agarose 1,0% à 100 V por cm.

## 5. Resultados

### 5.1 Isolamento de *C. neoformans* de excretas de pombos em oito diferentes locais (Grupos: I a VIII)

O gráfico abaixo (Gráfico 1) apresenta a distribuição dos diferentes locais avaliados exibindo presença de pombos.

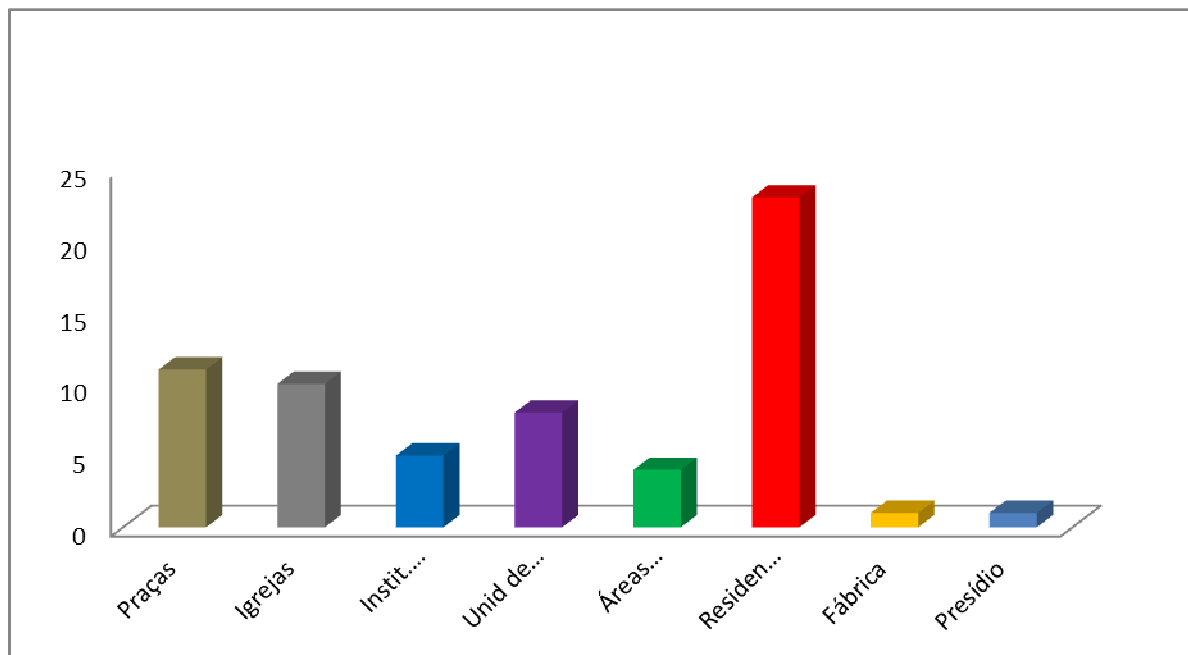


Gráfico 1 – Distribuição dos tipos de locais avaliados com presença de pombos

Foram obtidas 122 amostras de excretas ressecadas de pombos escolhidas aleatoriamente em distintos locais (Tabela 1).

Foi detectada a presença de excretas nos oito grupos avaliados. Entretanto, foi observado que considerando as praças, apenas em quatro das onze pesquisadas havia presença de excretas. Da mesma forma, em quatro das dez igrejas e três dos cinco estabelecimentos de ensino foi constatado o mesmo fato (concomitância entre presença de pombos e excretas) (Gráfico 2).

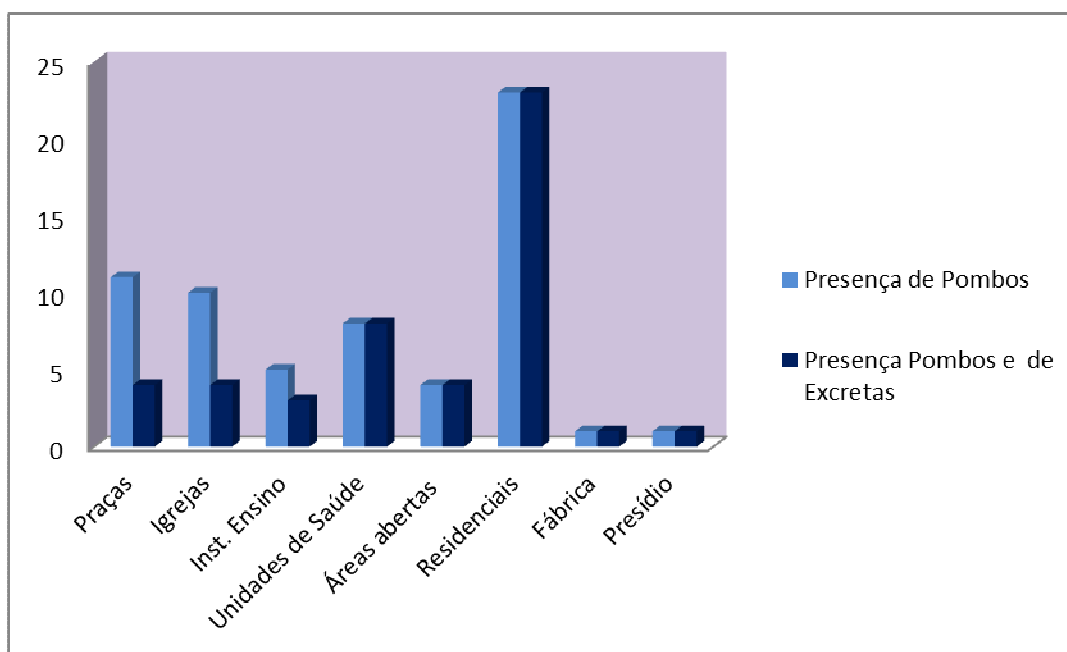


Gráfico 2 – Distribuição dos tipos de locais avaliados com presença de pombos e excretas

De acordo com os isolamentos de *C. neoformans* realizados, foi possível detectar que estas leveduras foram mais encontradas nas excretas de pombos procedentes dos residenciais avaliados (Tabela 1).

**Tabela 1-** Tipos e número de locais investigados (Grupos) e positividade (%) associada à presença de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos

| Locais (Grupos)                    | n         | Presença de excretas | Positividade (%)               |
|------------------------------------|-----------|----------------------|--------------------------------|
|                                    |           |                      | <i>Cryptococcus neoformans</i> |
| Grupo I - Praças                   | 11        | 05                   | 00                             |
| Grupo II - Igrejas                 | 10        | 04                   | 01 (25)                        |
| Grupo III - Instituições de ensino | 05        | 03                   | 01 (33)                        |
| Grupo IV - Unidades de Saúde       | 08        | 08                   | 00                             |
| Grupo V – Área abertas*            | 04        | 04                   | 00                             |
| Grupo VI - Residenciais            | 23        | 23                   | 04 (17)                        |
| Grupo VII - Fábrica                | 01        | 01                   | 00                             |
| Grupo VIII - Presídio              | 01        | 01                   | 00                             |
| <b>Total</b>                       | <b>63</b> | <b>49</b>            | <b>06 (12)</b>                 |

\*com cobertura de amianto

## 5.2 Isolamento de *C. neoformans* nos 8 grupos avaliados em Cuiabá e Várzea Grande

Considerando os diferentes grupos avaliados, foi possível detectar *C. neoformans* em uma de um total de quatro igrejas nas quais havia a presença de pombos e excretas. *C. neoformans* também foi isolado em uma das três instituições de ensino que eram habitadas por pombos e foi constatada de forma similar presença de excretas. Finalmente, em quatro dos vinte e três residenciais avaliados foram isoladas leveduras posteriormente identificadas como *C. neoformans* (Tabela 2).

**Tabela 2** – Percentual de isolamento de *C.neoformans* em diferentes grupos de ambientes de Cuiabá e Várzea Grande - MT, em relação à presença de excretas e ao número de locais avaliados

| Locais                 | Número (n) | Locais com presença de excretas | ISOLAMENTO      |                 |
|------------------------|------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|
|                        |            |                                 | <i>Absoluto</i> | <i>Relativo</i> |
|                        |            |                                 | N               | %               |
| Praças                 | 11         | 05                              | --              | --              |
| Igrejas                | 10         | 04                              | 1/4             | 25              |
| Instituições de ensino | 05         | 03                              | 1/3             | 33              |
| Unidades de Saúde      | 08         | 08                              | --              | --              |
| Áreas abertas *        | 04         | 04                              | --              | --              |
| Residenciais           | 23         | 23                              | 4/23            | 17              |
| Fabrica                | 01         | 01                              | --              | --              |
| Presídio               | 01         | 01                              | --              | --              |
| Total                  | 63         | 49 (78%)                        | <b>6/49</b>     | <b>12,2</b>     |

\*com cobertura de amianto

### 5.3. Amostras coletadas nos períodos (I) e (II)

Em relação à coleta das amostras realizada no período (I) foi possível observar que não foram isoladas leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. Em contraste, no período (II), foi possível constatar o isolamento de *C. neoformans* em duas amostras provenientes de igrejas, uma amostra proveniente de instituição de ensino e cinco amostras oriundas aos residenciais das 122 amostras coletadas (Tabela 3).

**Tabela 3** - Distribuição de amostras coletadas nos períodos I e II em locais distintos (grupos I a VIII)

| Locais            | Número de amostras coletadas (n) | Amostras coletadas no período I | Isolamento de <i>C. neoformans</i> (período I) | Amostras coletadas no período II | Isolamento de <i>C. neoformans</i> (período II) |
|-------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------|
| Praças            | 12                               | 08                              | 00                                             | 04                               | 00                                              |
| Igrejas           | 13                               | 03                              | 00                                             | 10                               | 02                                              |
| Instit. de ensino | 13                               | 05                              | 00                                             | 08                               | 01                                              |
| Unidade saúde     | 20                               | 13                              | 00                                             | 07                               | 00                                              |
| Áreas abertas*    | 11                               | 04                              | 00                                             | 07                               | 00                                              |
| Residenciais      | 44                               | 12                              | 00                                             | 32                               | 05                                              |
| Fábrica           | 03                               | 00                              | 00                                             | 03                               | 00                                              |
| Presídio          | 06                               | 00                              | 00                                             | 06                               | 00                                              |
| <b>Total</b>      | <b>122</b>                       | <b>45</b>                       | <b>00 (0,0%)</b>                               | <b>77</b>                        | <b>08 (6,6%)</b>                                |

\* com cobertura de amianto

#### 5.4 Positividade associada ao isolamento de *C. neoformans* em igrejas, instituições de ensino e residenciais

Em relação às quatro igrejas analisadas, apenas em uma – Basílica Nosso Senhor do Bonfim (Catedral Metropolitana de Cuiabá), foi obtido o isolamento de *C. neoformans* (Tabela 4) nas excretas presentes naquele local. Já, considerando as três instituições de ensino avaliadas, apenas em uma – Escola Cooperar, foi evidenciada da mesma forma a presença de *C. neoformans* (Tabela 5). Considerando o total (n=23) de residenciais analisados, foi possível detectar a presença de *C. neoformans* em quatro deles (Tabela 6).

**Tabela 4** – Positividade associada ao isolamento de *C. neoformans* nas Escolas / Instituições de ensino avaliadas no município de Cuiabá (MT)

| Instituição de ensino | Isolamento de <i>C. neoformans</i> |
|-----------------------|------------------------------------|
| UFMT                  | Negativo                           |
| UNIC                  | Negativo                           |
| Escola COOPERAR       | <b>Positivo</b>                    |

**Tabela 5** – Positividade associada ao isolamento de *C. neoformans* nas igrejas avaliadas no município de Cuiabá – MT

| Igrejas               | Isolamento de <i>C. neoformans</i> |
|-----------------------|------------------------------------|
| Igreja N S B Despacho | Negativo                           |
| Igreja Mãe dos Homens | Negativo                           |
| Capela São Mateus     | Negativo                           |
| Catedral              | <b>Positivo</b>                    |

**Tabela 6** – Positividade associada ao isolamento de *C. neoformans* nos residenciais avaliados no município de Cuiabá (MT)

| <b>Residenciais/ prédios/ sobrados</b>      | <b>Isolamento de <i>C. neoformans</i></b> |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Residência no bairro Santa Amália           | <b>Positivo</b>                           |
| Prédio residencial nobairro Bosque da Saúde | Negativo                                  |
| Residência no bairro Jardim Califórnia      | Negativo                                  |
| Prédio residencial Santa Inês Bloco 21      | Negativo                                  |
| Prédio residencial Santa Inês Bloco 34      | Negativo                                  |
| Prédio residencial Santa Inês Bloco 39      | Negativo                                  |
| Prédio residencial Santa Inês Bloco 55      | Negativo                                  |
| Prédio residencial Santa Inês Bloco 40      | Negativo                                  |
| Prédio residencial no bairro Popular        | Negativo                                  |
| Residência no bairro Jardim Kennedy         | <b>Positivo</b>                           |
| Residência no bairro Santa Rosa             | Negativo                                  |
| Residência no bairro Nova Várzea Grande     | Negativo                                  |
| Prédio residencial Paiaguás Bloco 1         | Negativo                                  |
| Prédio residencial Paiaguás Bloco 2         | Negativo                                  |
| Prédio residencial Paiaguás Bloco 3         | Negativo                                  |
| Prédio residencial Paiaguás Bloco 4         | Negativo                                  |
| Residência no bairro Bela Vista             | Negativo                                  |
| Edifício Boa Esperança                      | <b>Positivo</b>                           |
| Prédio residencial S Carlos Bloco 2         | Negativo                                  |
| Prédio residencial S Carlos Bloco 4         | Negativo                                  |
| Prédio residencial S Carlos Bloco 7         | Negativo                                  |
| Prédio residencial S Carlos Bloco32         | Negativo                                  |
| Residência e Buffet Anna Eugenia            | <b>Positivo</b>                           |

### 5.5 Percentual de isolamento de *C. neoformans* em diferentes locais nas 122 amostras coletadas.

Observou-se que *C. neoformans* apresentou maior positividade no grupo VI – residenciais (Tabela 7).

**Tabela 7** – Percentual de isolamento das amostras de *C. neoformans* em diferentes grupos em relação ao número total de amostras coletadas:

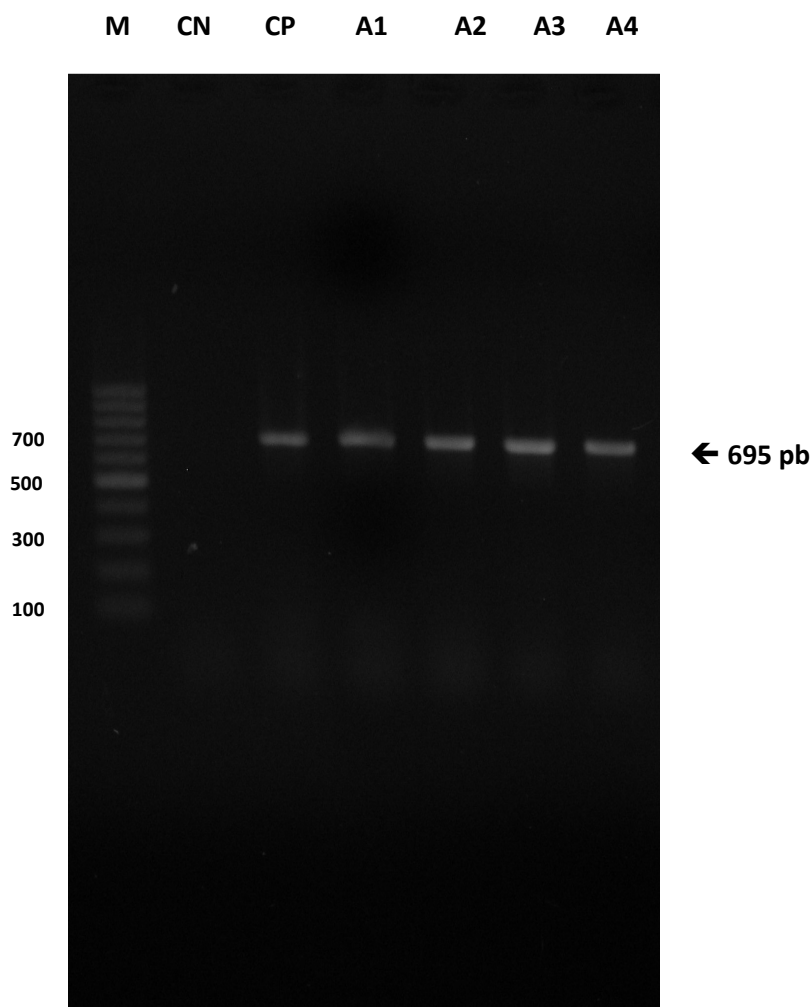
| Grupos/Tipo de Local        | Locais Coletados (n) | Número de amostras coletadas (n) | Amostras positivas para <i>C. neoformans</i> |
|-----------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------------------------------|
| Grupo I - Praças            | 05                   | 12                               | 00                                           |
| Grupo II - Igrejas          | 04                   | 13                               | 02                                           |
| Grupo VI- Instit. de Ensino | 03                   | 13                               | 01                                           |
| Grupo IV - Unidades Saúde   | 08                   | 20                               | 00                                           |
| Grupo V - Áreas abertas*    | 04                   | 11                               | 00                                           |
| Grupo VI -Residenciais      | 23                   | 44                               | 05                                           |
| Grupo VII - Fábrica         | 01                   | 03                               | 00                                           |
| Grupo VIII -Presídio        | 01                   | 06                               | 00                                           |
| <b>Total</b>                | <b>49</b>            | <b>122</b>                       | <b>08(6,6%)</b>                              |

\*com cobertura em amianto

## 5.6 Confirmação genotípica dos isolados de *C. neoformans*

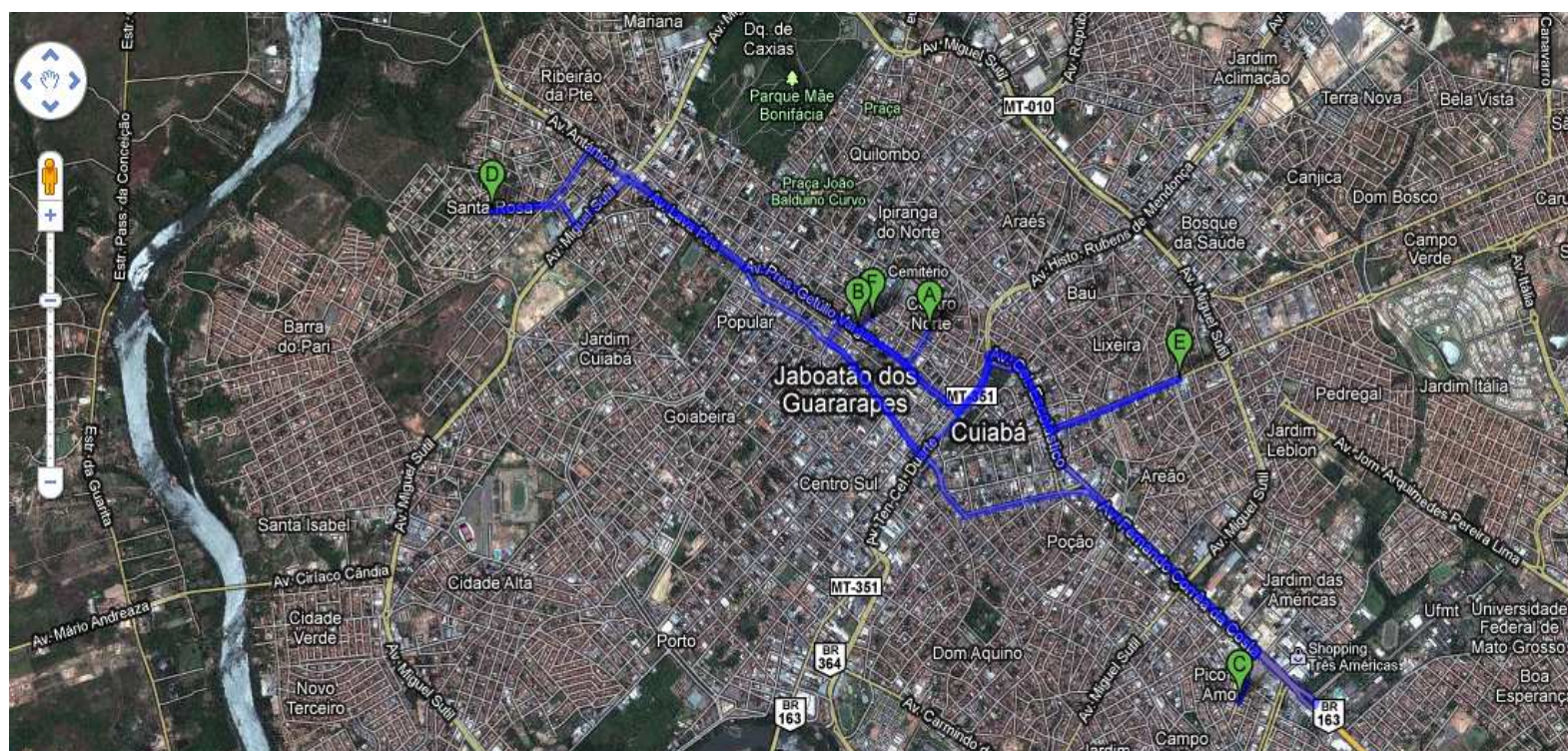
Das duas amostras exibindo positividade para *C. neoformans* na igreja Basílica Nosso senhor do Bonfim (Catedral), foram detectadas 8 UFC/mL. Já na instituição de ensino (COOPERAR), foi detectada presença de *C. neoformans* em apenas uma amostra das treze analisadas. Nesta amostra, foram detectadas 4 UFC/mL. Em relação aos residenciais, foram obtidas cinco amostras positivas para *C. neoformans* e 60 UFC/mL respectivamente.

Todas as UFC/mL foram submetidas à confirmação genotípica pela técnica de PCR através dos *primers* específicos utilizados. A figura 22 ilustra a amplificação de quatro UFC/mL das setenta e duas submetidas à reação de PCR.

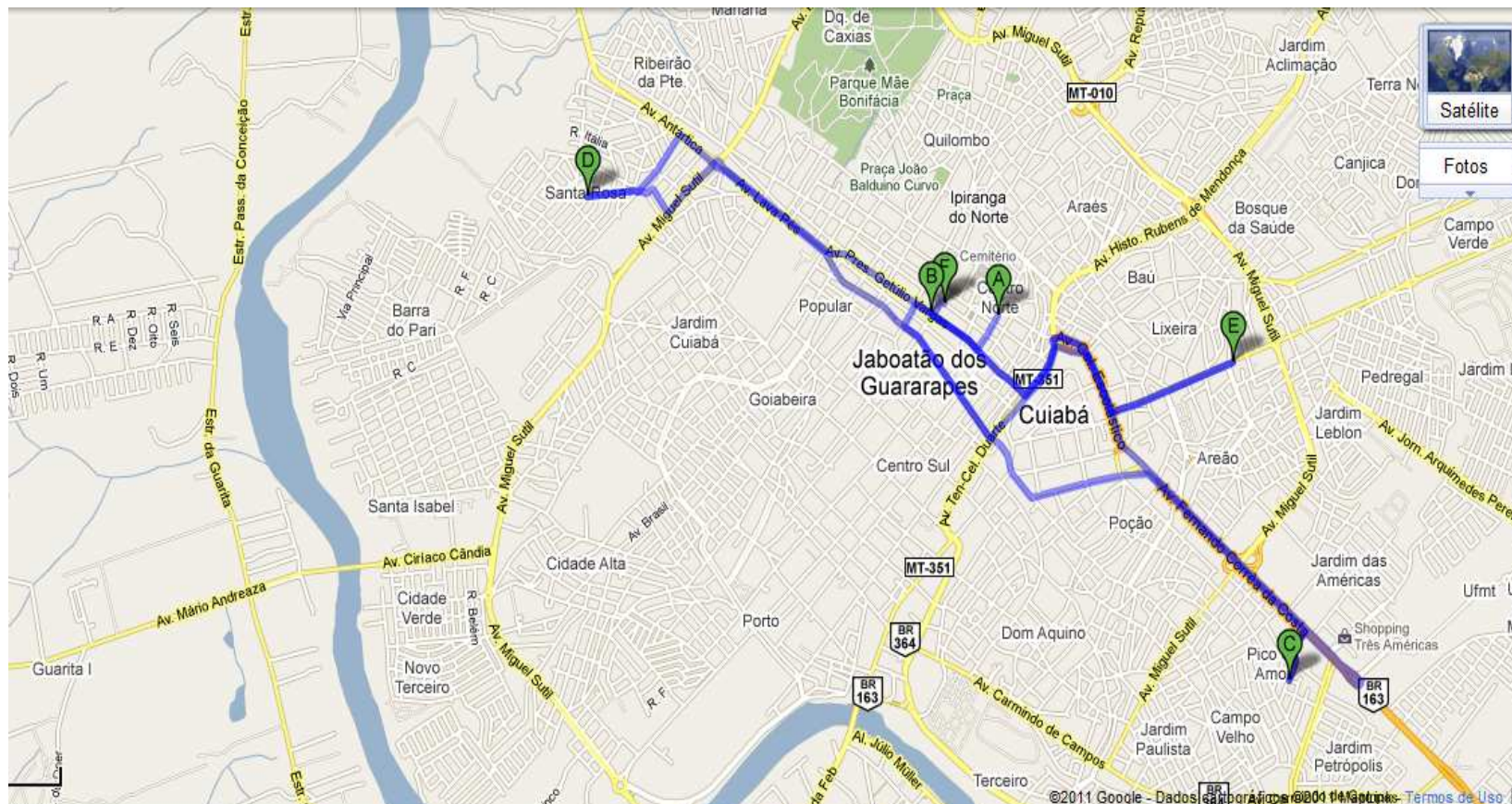


**Figura 22:** Amplificação por PCR de *Cryptococcus neoformans*, **M** – marcador 100 pb DNA ladder, 1 Controle Negativo (**CN**), 1 Controle Positivo (**CP**), e amostras isoladas – A1, A2, A3 e A4.

## 5.6 Locais no mapa do município de Cuiabá (satélite) nos quais foram isolados *C. neoformans*.



**Figura 23** – Mapa satélite do município de Cuiabá dos locais onde foram isolados *Cryptococcus neoformans*. A- Igreja – Basílica Nosso Senhor do Bonfim – Centro, B-Escola - Escola Cooperar – Centro, C- Residência Sobrado - Jardim Kennedy, D- Residência Jardim Santo Amália, E- Residência Bairro Lixeira, F- Edifício Boa Esperança – Centro / ( Fonte: Google Maps)



**Figura 24 – Mapa do município de Cuiabá da região na qual houve isolamento de *Cryptococcus neoformans*.** A- Igreja – Basílica Nosso Senhor do Bonfim – Centro, B- Escola - Escola Cooperar – Centro, C- Residência Sobrado - Jardim Kennedy, D- Residência Jardim Santo Amália, E- Residência Bairro Lixeira, F- Edifício Boa Esperança – Centro  
(Fonte: Google Maps)

## 6. Discussão

A deposição de excretas de pombos (*Columba livia*) em locais públicos pode servir como fonte de agentes infecciosos (*Cryptococcus* spp). Este fato assume importância em se tratando de saúde pública. O isolamento das leveduras do gênero *Cryptococcus* foi objeto deste estudo, realizado pela primeira vez nos municípios de Cuiabá e Várzea Grande – MT.

Já em 1951, Emmons, chama a atenção para a frequência com que cepas virulentas de *C. neoformans* eram isoladas de fezes ou ninhos de pombos, demonstrando que o fungo pode viver saprofiticamente em excretas daquelas aves, sendo facilmente isoladas daquele substrato. Posteriormente, os achados de Emmons foram confirmados nos Estados Unidos e no Japão.<sup>40,146,147,148</sup>

Neste estudo alguns fatos foram observados durante a coleta, os quais merecem destaque: a quantidade de excretas obtida durante a fase de coleta foi variável, sendo observado que em muitos locais era realizada a limpeza frequente dos distintos ambientes públicos avaliados. Desta forma, apesar da presença de pombos, foi verificado que não havia presença de excretas em todos os locais selecionados (dados mostrados no capítulo resultados – Tabela 1).

Foi observado também que na maioria dos locais visitados não havia presença de barreiras mecânicas para impedir o acesso dos pombos, recurso hoje bastante empregado para dificultar a aproximação dos mesmos de janelas, condicionadores de ar, e outras barreiras físicas.

O isolamento de cepas virulentas do fungo a partir de amostras de solo, foi relatado pela primeira vez no Brasil por Silva ainda em 1960.<sup>149</sup> Ainda em solo, Machado et al.

(1993) <sup>150</sup>, registraram na literatura a recuperação do fungo, na tentativa de correlacionar a história clínico-epidemiológica de pacientes acometidos por criptococose da Santa Casa na cidade de Porto Alegre – RS.

Neste estudo, foram apenas colhidas amostras representadas por excretas de pombos, não sendo incluídas amostras de solo. Porém, considerando trabalhos que analisaram amostras provenientes de excretas de pombos foi possível observar que os índices de positividade (%) de isolamento do fungo no Brasil variaram até o momento entre 4,3 a 31,3 %<sup>33,43,48,68,69,150,151,152,145,153,154,155,156</sup>. Os achados deste trabalho apontam um índice de positividade de 12 % para *Cryptococcus neoformans*, valores estes compatíveis com as taxas de isolamento brasileiras já referenciadas na literatura. Os locais eleitos para a coleta de amostras (excretas de pombos) foram representados por oito grupos distintos (dados mostrados no capítulo resultados – Tabela 1). Em relação a estes grupos, foi observado que os residenciais representaram os locais nos quais foram observados os maiores índices de positividade (Tabela 1). Este achado, pode representar risco à aquisição de criptococose, pois em vários residenciais avaliados, foi observado o hábito frequente de seus moradores alimentarem os pombos, atraindo-os e estimulando-os indiretamente à reprodução. Restos alimentares foram também encontrados nestes locais, sendo reflexo de cuidados precários de higiene nas áreas comuns destes recintos domiciliares.

Foram analisadas dez igrejas na cidade de Cuiabá, sendo verificada a presença de excretas em quatro, e positividade para *C. neoformans* em apenas uma (dados mostrados no capítulo resultados – Tabela 5). Ao todo foram coletadas 13 amostras, sendo constituídas por três referentes ao período I e dez ao II. Baroni et al. (2006) <sup>43</sup> avaliaram a presença de *C. neoformans* na cidade do Rio de Janeiro também em dez igrejas. Amostras de excretas foram obtidas além de amostras de ar em torres de igrejas, além de áreas vizinhas às mesmas. O período para coleta das amostras foi igual a um ano, e estes autores conseguiram o isolamento

da levedura em 37,8% de 219 amostras de excretas de pombos. Em relação às amostras de ar, foram obtidas quinze (4,9%) positivas. É sabido que as altas temperaturas do verão podem inibir o crescimento de *C. neoformans*, devido possivelmente a inativação da levedura. Cuiabá é conhecida por suas temperaturas elevadas, fator este que deve ser considerado no que tange às taxas menores referentes à recuperação do fungo nas excretas de pombos presentes nos locais avaliados. Obviamente, o isolamento do fungo *C. neoformans* em excretas de pombos depende de muitos outros fatores ambientais abrangendo inclusive a quantidade de excretas obtidas nos pontos amostrados. As torres das igrejas podem ser consideradas um dos locais em que os pombos fazem seus ninhos, depositam as excretas, e a partir daí pode ocorrer disseminação de propágulos pelo ar, de acordo com a rota migratória destas aves. Vale ressaltar que de acordo com Bulmer (1990) <sup>157</sup>, o problema consiste na viabilidade de *C. neoformans* em excretas secas por um período de dois anos. Com base nesta informação construções antigas e torres de igrejas também antigas podem ser considerados nichos ecológicos para *C. neoformans* e deveriam ser avaliadas periodicamente por autoridades em saúde pública. Em Cuiabá, a maioria das igrejas apresenta idade elevada (superior a 50 anos) sendo consideradas inclusive monumentos históricos devido a própria idade da cidade, a qual completou no ano de 2011, duzentos e noventa e dois anos.

Conhecer os nichos ecológicos urbanos de *C. neoformans* é fato que se reveste de importância devido às manifestações clínicas da criptococose, doença fúngica grave por suas taxas de mortalidade e morbidade no Brasil. <sup>25</sup> A partir do conhecimento dos possíveis nichos, e posterior sorotipagem das cepas isoladas nas excretas de pombos, seria interessante investir em possíveis correlações clínico- epidemiológicas com cepas isoladas de materiais clínicos provenientes de pacientes que vivem no perímetro urbano das cidades de Cuiabá e Várzea Grande, e adquiriram criptococose por *C. neoformans*.

Passoni et al. (1998)<sup>33</sup>, avaliaram 154 habitações humanas na região metropolitana do Rio de Janeiro. Foram coletadas um total de 824 amostras de poeira do interior, ao ar livre, do solo e fezes de aves. Estes autores obtiveram êxito quanto ao isolamento de *C. neoformans* em 20 (13%) residências, representando cinco (15,6%) de um total de 32 residências de pacientes com AIDS, porém sem criptococose, e 11 (14,3%) das 77 habitações de indivíduos aparentemente saudáveis ( $p > 0,05$ ). O principal fator associado à contaminação domiciliar por *C. neoformans* foi a presença de pássaros adquiridos no mercado doméstico e presentes no ambiente das casas. Este trabalho realizado por Passoni et al. demonstrou a importância do estabelecimento de correlações clínico epidemiológicas em se tratando das possíveis fontes de aquisição da criptococose.

Excretas de pombos não infectadas podem tornar-se infectadas quando expostas ao ar contendo células aerossolubilizadas de *C. neoformans*.<sup>23</sup> Krockenberger et al. (2002)<sup>158</sup>, observaram que coalas sem colonização nasal por *C. gattii* quando transferidos para locais com alta prevalência ambiental de *C. gattii* tornavam-se persistentemente colonizados. A afirmação destes autores suscita a reflexão de que em todos os locais nos quais haviam excretas de pombos na área urbana de Cuiabá e Várzea Grande, em que pese a positividade detectada de apenas 12% para *C. neoformans*, pode haver dispersão de partículas aerossolubilizadas e contaminação de outros excretas que exibiram resultados negativos em relação ao isolamento do fungo. O índice de positividade (12%) para isolamento de *C. neoformans* de excretas de pombos detectado neste estudo, concorda com os valores encontrados por Lopes–Martinez et al. (1995)<sup>159</sup>, os quais analisaram 711 amostras de várias fontes ambientais na cidade do México tais como: fezes de aves, frutas e vegetais; relatando a presença de *C. neoformans* em 9,5% das amostras de fezes, 9,5% nas frutas e 4,2% nos vegetais. Em contraste, em outro estudo realizado na cidade de Bogotá (Colômbia), 480 amostras de detritos de árvores e 89 amostras de fezes foram investigadas. Das amostras de

plantas, 99% foram caracterizadas como *C. gattii*, e 1% como *C. neoformans* var *grubii*; já das amostras de fezes somente foi isolada a variedade *grubii*.<sup>160</sup>

Além de excretas de pombos, *C. neoformans* var *grubii* já foi isolada em fezes de outras aves no Brasil. Filiú et al. (2002)<sup>42</sup> demonstraram a presença deste fungo em 50% das 20 amostras de excretas de aves de cativeiros na cidade de Campo Grande – Mato Grosso do Sul. Dados semelhantes foram relatados por Abegg et al. (2006)<sup>88</sup>, os quais isolaram *C. neoformans* var *grubii* em 87% das amostras de excretas de psitacídeos no Rio Grande do Sul. Passoni (1998)<sup>33</sup>, encontrou em torno de 15% de positividade referente ao isolamento de *C. neoformans* em excretas de aves de cativeiro como: canários, periquitos e outros psitacídeos. Estes achados reforçam então que outras aves, além de pombos, podem constituir risco à aquisição de criptococose. Mitchell & Perfect (1995)<sup>46</sup> relataram que é grande o número de indivíduos com anticorpos circulantes após exposição e manejo de aves e habitats contaminados com propágulos de *C. neoformans*, porém, podem não desenvolver a doença. *C. neoformans* infecta indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos, com variações nos achados clínicos e radiológicos.

Várias outras espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus* foram isoladas em cloacas de pombos por Rosário et al. (2005).<sup>81</sup> Estes autores discutem que a cloaca destas aves pode funcionar como transportadora de diferentes espécies (*C. neoformans*, *C. laurentii*, *C. uniguttulatus* e *C. albidus*), as quais seriam expelidas nas fezes, representando substrato rico em nitrogênio não proteico favorecendo o crescimento destes microrganismos.

Considerando as praças públicas avaliadas neste estudo, os achados encontrados em Cuiabá contrastam com aqueles registrados em Porto Alegre por Reolon et al. (2004)<sup>69</sup>. Estes autores afirmaram que em todas as praças (n=5) nas quais foi realizada pesquisa de leveduras do gênero *Cryptococcus*, em um total de 88 amostras coletadas, foi obtida uma

positividade igual a 88 (100%) das amostras avaliadas. Neste estudo, das 11 praças avaliadas, em nenhuma foi possível o isolamento de leveduras do gênero *Cryptococcus*, apesar da presença de excretas em 05 praças. Os autores que realizaram o estudo em Porto Alegre não mencionaram o período em que foi realizado a coleta de material e nem estação do ano, impossibilitando a comparação de fatores que poderiam interferir no isolamento das leveduras em cidades com condições bioclimáticas bastante distintas (Cuiabá e Várzea Grande *versus* Porto Alegre). Entretanto, foi possível analisar que o método empregado para isolamento das leveduras a partir das excretas de pombos foi similar, apesar de Reolon e colaboradores não terem confirmado genotipicamente a identidade dos isolados de *C. neoformans* como realizado neste estudo.

Mais recentemente (2008), Silva & Capuano, coletaram 68 amostras de “pools” de excretas de pombos depositados em quatro áreas públicas da cidade de Ribeirão Preto – SP para a pesquisa de *Cryptococcus* spp.<sup>155</sup> Os resultados evidenciaram positividade igual a 75% para estas leveduras, além da presença de parasitas (32%), e concomitância entre os dois agentes (fungos e parasitas = 25%). Os autores ressaltaram neste trabalho a dificuldade do isolamento das leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus* devido ao crescimento rápido e exuberante de fungos micelianos contaminantes, além de bactérias, perceptíveis no segundo dia de incubação. Este fato foi bastante freqüente durante o decorrer dos experimentos realizados em Cuiabá, e contornado a partir do plaqueamento em duplicata de todas as amostras semeadas. Em Ribeirão Preto, Silva & Capuano, não conseguiram isolar *C. neoformans*, relatando as espécies: *C. laurentii* (n=43), *C. uniguttulatus* (n=3) e *C. laurentii* associado com *C. albidus* (n=4) e *C. uniguttulatus* associado com *C. laurentii* (n=1). Os autores relataram que estas espécies já foram responsáveis por quadros de afecções pulmonares, abscessos e dermatomicoses. Anteriormente, na cidade de Ribeirão Preto, Pedroso (2004)<sup>161</sup>, isolou *C. neoformans* em 21% de 62 amostras de fezes de pombos. Silva &

Capuano (2008), atribuíram as diferenças associadas ao isolamento de espécies distintas registradas na cidade de Ribeirão Preto ao período de coleta das amostras – agosto a dezembro (Pedroso) e janeiro a setembro (Silva & Capuano). Entretanto, em Cuiabá as coletas foram realizadas entre os meses de julho a dezembro e foram isoladas tanto *C. neoformans* como outras espécies não identificadas, porém classificadas como *Cryptococcus* spp. Desta forma, é possível inferir que o isolamento de espécies distintas não estaria apenas relacionado ao período no qual as amostras foram obtidas.

Ainda no estado de São Paulo, na cidade de Santos, outro estudo foi conduzido em 2005, no qual 116 amostras foram analisadas, sendo 79 correspondentes às excretas de pombos e 37 ao ar atmosférico de regiões com acúmulo de fezes. Foi isolado *C. neoformans* de 11 (13,9%) amostras de excretas, além de outras espécies (*C. laurentii* – 8,9%, *C. albidus* – 12,6%), sendo este último também isolado das amostras de ar.<sup>162</sup> Os valores encontrados por estes autores são próximos aos registrados neste estudo considerando as excretas de pombos (taxa de positividade para *C. neoformans* igual a 12% em todos os locais avaliados – grupos I a VIII – dados mostrados na tabela 1 do capítulo resultados).

Na cidade de Pelotas – RS em 2010, Faria et al. avaliaram 70 ambientes incluindo praças, prédios históricos (n=8), torres de igreja (n=1), engenhos e armazéns de arroz (n=7), praça (n=1), e locais ao ar livre (n=9). De todos estes locais, foi verificado o isolamento de *C. neoformans* em 26,9% (n=7/26). Dos engenhos e armazéns visitados, em sete foram encontrados presença de pombos.<sup>156</sup> Este dado coincide parcialmente com o achado em Cuiabá, pois em apenas uma fábrica analisada também foi encontrada presença de excretas, porém não foi isolado *C. neoformans* e sim *Cryptococcus* spp. Já nas praças da cidade de Pelotas, das 14 avaliadas apenas em uma (11,1%) foi encontrada uma quantidade média de excretas, da qual foi isolado *C. neoformans*. Este achado difere dos encontrados neste estudo, onde os resultados obtidos confirmaram a presença de *Cryptococcus* spp e não *C. neoformans*

na única praça em Cuiabá na qual foi possível isolar as leveduras a partir dos excretas de pombos. A cidade de Pelotas não apresenta temperaturas extremas e a umidade relativa do ar é elevada. Este aspecto contrasta com as condições bioclimáticas de Cuiabá e Várzea Grande onde ocorrem temperaturas não muito elevadas no mês de julho, porém apresentam umidade relativa do ar baixa. Nos meses de agosto, setembro e outubro, as temperaturas se elevam consideravelmente, porém a umidade relativa do ar continua extremamente baixa, e até pode atingir níveis mais elevados (críticos).

Neste estudo, vale ressaltar que em alguns locais com presença de excretas (presídio, residenciais e igrejas), foi observado além destes dejetos, presença de penas, restos de ovos, pombos mortos em decomposição, associados à pouca ventilação de alguns ambientes, fatores estes úteis à manutenção da viabilidade e multiplicação da levedura. Outros autores <sup>156</sup> relataram recentemente condições similares nos prédios históricos avaliados na cidade de Pelotas – RS. Nos residenciais avaliados em Cuiabá, foi detectada significativa presença de excretas frescas, sendo que outros autores relatam que nestas condições há uma intensa proliferação bacteriana, culminando com pH alcalino responsável pela inibição do crescimento da levedura. Fato interessante também é que o pombo doméstico não retira o material fecal do ninho, permitindo assim que se formem pilhas de substrato no período de reprodução, favorecendo o desenvolvimento da levedura.

Em outros estudos realizados fora do Brasil (Turquia, 1998), Yildiran e colaboradores apontaram índices baixos de positividade (4,6%) referente ao isolamento de *C. neoformans*, correspondendo a 29 de um total de 634 amostras analisadas.<sup>163</sup>

Em 2010, Zarrin e colaboradores pesquisaram a presença de *C. neoformans* em 65 amostras de excretas de pombos em dez locais distintos locais em Ahwaz, no Irã.<sup>164</sup> Estes

autores registraram 22 (34%) de positividade para *C. neoformans*, sendo este valor superior ao detectado neste estudo (12%).

Finalmente a positividade encontrada para *C. neoformans* em uma instituição de ensino, uma igreja e quatro residenciais avaliados neste estudo evidencia o risco de exposição de indivíduos imunosuprimidos e mesmo aqueles imunocompetentes às leveduras do gênero *Cryptococcus*, estando todos susceptíveis à aquisição de criptococose. Devido à importância das excretas de pombos como reservatório e fonte de infecção destas leveduras, fazem-se necessárias medidas que visem redução de aves, por meio da manutenção de condições de higiene, aeração, iluminação e ventilação adequadas.<sup>42,88</sup> A simples limpeza adequada dos ambientes pode ser eficiente, além da não oferta de alimentos aos pombos especialmente nos residenciais.

Os resultados obtidos neste estudo apontam evidências sobre a presença de agentes da criptococose em Cuiabá e Várzea Grande em excretas de pombos depositados em locais públicos e residenciais e que, em um segundo momento seria interessante conhecer os sorotipos circulantes nestes municípios. Futuros estudos incluindo outros locais públicos e um número maior de amostras se fazem necessários com o objetivo de mapear mais detalhadamente a área urbana e detectar possíveis focos urbanos destes fungos.

## 7. Conclusões

1. Foi possível confirmar a presença de *Cryptococcus neoformans* em locais públicos (igrejas e unidade de ensino) e residenciais no município de Cuiabá sendo que a maior concentração de amostras e consequente isolamento de leveduras foi observada nos prédios residenciais.
2. Foram confirmadas as identidades fenotípica através das técnicas (CGB e urease) de *C. neoformans* e genotípica dos mesmos pela técnica de PCR.
3. Nos ambientes nos quais foi possível realizar o isolamento de *C. neoformans*, houve forte semelhança no que se refere à presença de: pombos em decomposição, ninhos, ovos e penas.

## 8. Referências

1. Fernandes OFL, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJSC, Silva MRR. *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. Rev Soc Bras Med Trop. 2000; 33(1):75-78.
2. Kwon Chung & Bennett. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol. 1984; 120(1): 123-130.
3. Kwon-Chung KJ; Varma SA. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res. 2006; 6:574-587.
4. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Boekhout T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. Rev Iberoam Micol. 2008; 25: S4-S172.
5. Lester SJ, Malik R, Bartlett KH, Duncan CG. Cryptococcosis update and emergence of *Cryptococcus gattii*. Vet Clin Pathol. 2011; 1-14.
6. Ministério da Saúde do Brasil – Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do programa nacional de DST/AID. Brasília. 2002.(site: [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br)), acesso em 10/08/2010.
7. Jongwutiwes U, Kiertiburanankul S, Sungkanuparph S. Impact of antiretroviral therapy on the relapse of cryptococcosis and survival of HIV-infected patients with cryptococcal infection. Curr HIV Res. 2007; 5(3): 355-360.
8. Antinori S, Ridolfo AL, Fasan M, Magni C, Galimberti L, Milazzo L, Sollima S, Adorni F, Giuliani G, Galli M, Corbellino M, Parravicini C. AIDS-associated cryptococcosis: a comparison of epidemiology, clinical features and outcome in the pre-and post-HAART eras. Experience of a single centre in Italy. HIV Med. 2009; 10: 6–11.
9. Correa MPSC, Oliveira EC, Duarte RRBS, Pardal PPO, Oliveira FM, Severo LC. Cryptococcosis in children in the State of Pará Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32(5); 505-508.
10. Santos WRA; Meyer W; Wanke B; Costa SPSE; Trilles L; Nascimento JLM; Medeiros R; Morales BP; Bezerra CCF; Macedo RCL; Ferreira SO; Barbosa GG; Perez MA; Nishikawa MM; Lazéra MS. Primary endemic Cryptococcosis gattii by molecular type VGII in the State of Pará Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2008; 103 (8): 813-818.
11. Severo CB, Gazzoni AF, Severo LC. Capítulo 3: criptococose pulmonar. J bras pneumol. 2009; 35 (11), 1136-1140.
12. Prado M; Silva MB; Laurenti R; Travassos LR; Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009; (3): 513-521.

13. Ribeiro LC, Hahn RC, Favalessa OC, Tadano T, Fontes CJF. Systemic mycosis: factors associates with death among patients infected with the human immuno deficiency vírus,. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42(6): 698-705.
14. Emmons CW Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). Amer J Hyg. 1955; 62: 227-232.
15. Currie BP, Freundlich LF, Casadevall A. Restriction fragment polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (Pigeon Excreta) and Clinical Sources in New York City. J Clin Microbiol. 1994; 1188-1192.
16. Passoni LFC. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. Rev. iberoam Micol. 1999; 16: 77-81.
17. Lacaz SC, Porto E, Martins JEC, Heins Vaccari EM, MELO NT. Criptococose. In: Tratado de Micologia Médica, 9ªed. São Paulo, Sarvier; 416-440, 2002.
18. Feng X, Yao Z, Ren D, Lia W. Simultaneous identification of molecular and mating types within the *Cryptococcus* species complex by PCR-RFLP analysis. J Med Microbiol. 2008; 57:1481-1490.
19. Ngamskulrungrroj P, Gilgado F, Faganello J, Litvintseva AP, Leal AL, Tsui KM, Mitchell TG, Vainstein MH, Meyer W. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. Plos ONE. 2009; 4(6): e5862.
20. Souza LKH, Souza Junior AH, Costa CR, Faganello J, Vainstein MH, Chagas ALB, Souza ACM & Silva MRR. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. Mycoses. 2009; 53: 62-67.
21. Springer D J, Chatuverdi V. Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii*. Emerg Infect Dis. 2010; 16(1): 14-20.
22. Sorrel TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. Med Mycol. 2001; 39(2); 155-168.
23. Casadevall A & Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 1998. p10-56.
24. Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. Microbiology. 2001; 147: 2355-2365.
25. Pappalardo MCM & Melhem MSC. Cryptococcosis: A review of the Brazilian experience for the disease. Rev Inst Med trop Sao Paulo. 2003; 45(6): 299-305.
26. MacDougall L, Kidd SE, Galanis E, Mak S, Leslie MJ, Cieslak PR, Kronstad JW, Morshed MG & Bartlett KH. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada and detection in the Pacific Northwest, USA. Emerg Infect Dis. 2007; 1(1): 42–50.

27. Kwon-Chung KJ & Bennett JE. Cryptococcosis. In: Kwon-Chung KJ & Bennett JE. Med Mycol. Lea & Febiger, Philadelphia; 1992. p. 397-496.
28. Benham RW. Cryptococcosis and blastomycosis. Ann NY Acad Sci. 1950; 50: 1299-1314
29. Evans EE. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. J Immunol. 1950; 64: 423-430.
30. Wilson DE, Bennett JE, Bailey JW. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. Proc Soc Exp Biol Med. 1968; 127: 820-823.
31. Rosario I, Acosta B, Colom F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus spp.* Rev Iberoam Micol. 2008; 25: S13-S18.
32. Tsiodras S, Kelesidis T, Kelesidi I, Bauchinger U, Falagas ME. Human infections associated with wild birds. J Infect. 2008; 56:83-98.
33. Passoni LFC, Wanke B, Nishikawa MM, Lazéra MS. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. Med. Mycol. 1998; 36: 305-311.
34. Bonini, RK. Pombos em áreas urbanas. In: *Reunião Anual do Instituto Biológico*, São Paulo, SP: O Biológico. 60(2), 2003.
35. Haag-Wackernagel D. The feral pigeon: History – Problems – Solutions. Ornithologische Beobachter. 2003; 100 (1): 33-57.
36. Rippon, JW. Cryptococcosis. In J. W. Rippon (ed.) Medical mycology, the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. The W. B. Saunders Co.; 1988, Philadelphia : 595-599.
37. Drouhet E. Milestones in the history of *Cryptococcus* and cryptococcosis. J. Mycol. Med. 1997; 7:10-27.
38. Hibbett DS. A higher level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res. 2007; 111(5): 509-547.
39. Perfect JR, & Casadevall A. Cryptococcosis. Infect Dis Clin N Am. 2002; 16: 837-874.
40. Emmons CW. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. J. Bact. 1951; 62: 685-690.
41. Lazéra MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. Med. Mycol. 2000; 38(5): 379-383.
42. Filiú WFO, Wanke B, Agüena SM. Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35(6): 591-595.

43. Baroni FA, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTB, Gambale. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2006; 48(2): 71-75.
44. Lin X & Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Annu Rev Microbiol. 2006; 8: 69-105.
45. Swinne D, Michael D, Laroche R, Floch JJ, Pierre K. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). AIDS. 1989; 3(6): 389-390.
46. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. Clin Microbiol Rev. 1995; 8: 515-548.
47. Littman LM, Borok R. Relation of the pigeon to cryptococcosis: Natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. Mycopathol Mycol Appl . 1968; 35: 922-933.
48. Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. Med Mycol. 2000; 38: 385-390.
49. Granados DP, Castañeda E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of Ecological conditions in the Area. Microb. Ecol. 2005; 49: 282-290.
50. Abou-Gabal M, and Atia M. Study of the role of pigeons in the dissemination of *Cryptococcus neoformans* in nature. Sabouraudia, 1978; 16: 63-68.
51. Swinne-Desgain D. *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons following its experimental administration. Sabouraudia. 1976; 14: 313-317.
52. Toffaletti DL, Del Poeta M, Rude TH, Dietrich F, Perfect JR. Regulation of cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) expression in *Cryptococcus neoformans* by temperature and host environment. Microbiology. 2003; 149:1041-1049.
53. Powell KE, Dahl BA, Weeks RJ, Tosh FE. Airborne *Cryptococcus neoformans*: particles from pigeon excreta compatible with alveolar deposition. J Infect Dis. 1972; 125: 412-415.
54. Buchanan KL & Murphy JW. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? Emerg Infect Dis. 1998; 4(1): 71-63.
55. Lazéra MS, Igreja RP, Wanke B. Criptococose. In: Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia Médica: À luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A; 2004. p.89-101.
56. Marra RE, Huang JC, Fung E, Nielsen K, Heitman J, Vilgalys R, Mitchell TG. A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*). Genetics. 2004; 167: 619-631.

57. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-*neoformans* Cryptococcal Infections: a Systematic Review. *Infection*. 2007; 35(2): 51-58.
58. Ajello L. Soil as natural reservoir for human pathogenic fungi. *Science*, 1956; 123(3203): 876-879.
59. Baró T, Torres-Rodrigues JM, Morera Y, Alia C., Lopez O, Mendez R. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. *J. Clin. Microb.* 1999; 37: 1170-1172.
60. Steenbergen J N, Casadevall A. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) isolates in New York City. *J. Clin. Microb.* 2000; 38: 1974-1976.
61. Litvintseva AP, Thakur R, Reller B, Mitchell TG. Prevalence of Clinical Isolates of *Cryptococcus gattii* Serotype C among Patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. *J. Infect. Disease*. 2005; 192: 888-892.
62. Canteros CE, Brudny M, Rodero L, Perrota D, Davel G. Distribution of *Cryptococcus neoformans* serotypes associated with human infections in Argentina. *Revist. Argent. Microbiol.* 2002; 34 :213-218.
63. Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, Chindamporn A, Sukroongreung S, John MA, Ellis DH, Sorrel TC. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*. 1999; 20:1790-1799.
64. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E & Iberoamerican Cryptococcal Study Group. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(2): 189-195.
65. Montagna, M.T.; Santacroce, M.P.; Caggiano, G.; Tato, D.; Ajello, L. Cavernicolous habitats harbouring *Cryptococcus neoformans* : results of a speleological survey in Apulia, Italy, 1999-2000. *Med Mycol*. 2003; 41: 451-455.
66. Gokulshankar S, Ranganathan S, Ranjith MS, Ranjithsingh AJ. Prevalence, serotypes and mating patterns of *Cryptococcus neoformans* in the pellets of different avifauna in Madras, India. *Mycoses*, 47: 310-314, 2004.
67. Tay ST, Chai HC, Na SL, Hamimah H, Rohani MY, Soo-Hoo TS. The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from bird excreta in Klang Valley, Malaysia. *Mycopathologia*. 2005; 159: 509-513.
68. Lazéra MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Vet Mycol*. 1993; 31: 449-454.

69. Reolon A, Perez LRR, Mezzari A. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in urban pigeons of Porto Alegre(RS), Brazil. J Bras Patol Med Lab. 2004; 40(5): 293-298.
70. Lugarini C. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas Passeriformes e psittaciformes no estado do Paraná.[Tese de Mestrado] Curitiba. Universidade Federal do Paraná; 2007. 92 p. Mestrado em Ciências Veterinárias.
71. Costa A K, Sidrim J J, Cordeiro R A, Brilhante R S N, Monteiro A J, Rocha M F. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeast: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. Mycopathologia. 2010; 169(3): 207-213.
72. Fernandes OFL, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJSC, Silva MRR. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. Rev. Soc Bras Med Trop. 2000;33(1):75-78.
73. Bauwens L, Swinne D, De Vroey C, De Meurich W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the avaries of the Antwerp Zoological Garden. Mycosen. 1986; 29: 291-294.
74. Lazéra MS, Pires FDA, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CCF, Trilles L, Wanke B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. J Med Vet Mycol. 1996; 34: 127–131.
75. Lazéra MS, Cavalcante MAS, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in pottery tree hollow. Med Mycol. 1998; 36: 119-122.
76. Lindenberg ASC, Chang MR, Paniago AMM, Lazéra MS, Moncada PMF, Bonfim GF, Nogueira SA & Wanke B. Clinical and Epidemiological features of 123 cases of Cryptococcosis in Mato Grosso Sul, Brazil. Rev Inst Med trop S Paulo. 2008; 50(2): 75-78.
77. Favalessa OC, Ribeiro LC, Tadano T, Fontes CJ, Dias FB, Coelho BPC, Hahn RC. First description of phenotypic profile and in vitro drug susceptibility of *Cryptococcus spp* yeast isolated from HIV – positive and HIV- negative patients in State of Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42(6): 661-665.
78. Wanke B, Lazéra MS, Nucci M. Fungal infections in the immunocompromised host . Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000; 95, suppl. I: 153-159.
79. Ellis D. Clinical Mycology. The Human Opportunistic Mycoses. New York: Pfizer Inc. (Pub.); 1994.
80. Randhawa HS, Paliwal DK. Survey of *Cryptococcus neoformans* in the respiratory tract of patients with bronchopulmonary disorders and in the air. Sabouraudia. 1979; 17: 399-404.
81. Rosario I, Mendonza MH, Déniz S, Soro G, Álamo I, Acosta B. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. Mycoses. 2005; 48, 421-424.

82. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. 2009; 23(4): 525-530.
83. Dupont B, Graybill JR, Armstrong D, Laroche R, Touzé JE, Wheat LJ . Fungal infections in AIDS patients. *J Med Vet Mycol*. 1992; 30 (Suppl. 1): 19-28.
84. Kappe R, Levitz S, Harrison TS, Ruhnke M, Ampel NM, Just-Nübling G. Recent advances in cryptococcosis, candidiasis and coccidioidomycosis complicating HIV infection. *Med Mycol*, 1998; 36 (Suppl. 1): 07-215.
85. Pedroso RS, Costa KRC, Ferreira JC & Candido RC. Evaluation of melanina production by *Cryptococcus* species in four diferente cultura media. *Rev Soc Bras de Med Trop*. 2007; 40(5): 566-568.
86. Kwon-Chung, K. J. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*. 1976; 68: 821–833.
87. Polacheck I, Kwon-Chung KJ. Cretinine metabolismo in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillisporus*. *J Bacterol*. 1980; 142: 15-20.
88. Abegg MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*. 2006; 161: 83-91.
89. Casadevall A & Pirofski L. Host–pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun*. 1999; 67: 3703–3713.
90. Steenbergen JN & Casadevall A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect*. 2003;5(7):667-675.
91. Villena SN, Pinheiro RO, Pinheiro CS, Nunes MP, Takiya CM. Reis GA, Previato JO, Mendonça-Previato L, Freire-de-Lima CG. Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Cell Microbiol*. 2008; 10(6):1274-1285.
92. Voelz K & May RC. Cryptococcal interactions with in the host Immune System. *Eukaryot Cell* . 2010; 9(6): 835-846.
93. Pedroso RS, Costa KRC, Ferreira JC & Candido RC. Evaluation of melanina production by *Cryptococcus* species in four diferente cultura media. *Rev Soc Bras de Med Trop*. 2007; 40(5): 566-568.
94. Schmiel DH & Miller VL. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect*. 1999; 1: 1103-1112.
95. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Micro Rev*. 2000; 13: 122-143.

96. Cox GM, McDade HC, Chen SCA, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC, Sorrell TC, Leidich SD, Casadevall A, Ghannoum MA, Perfect JR. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* 2001; 39(1):166-175.
97. Curtis J L, Huffnagle GB, Chen G H, Warnock M L, Gyetko M R, McDonald R A, Scott P J , Toews GB. Experimental murine pulmonary cryptococcosis. Differences in pulmonary inflammation and lymphocyte recruitment induced by two encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans*. *Lab Invest.* 1994; 71, 113–126.
98. Mobley H L, Hu L T, Foxal P A. Helicobacter pylori urease: properties and role in pathogenesis. *Scand J Gastroenterol.* 1991; 187: 39-46.
99. Canteros CE, Brudny M, Rodero L, Perrota D, Davel G. Distribution of *Cryptococcus neoformans* associated with human infections in Argentina. *Revist Argent Microbiol.* 2002; 34:213-218.
100. Zimmer B L & Roberts GD. Rapid selective urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* 1979; 10: 380-381.
101. Olszewski MA, Noverr M C, Chen G H, Toews G B, Cox G M, Perfect J R & Huffnagle G B. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am J Pathol.* 2004; 164:1761-1771.
102. Varma A, Wu S, Guo N, Liao W, Lu G, Li A, Hu Y, Bulmer G, Kwong-Chung KJ. Identification of a novel gene Ure2, that functionally complements a urease-negative clinical strain of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* 2006; 152:3723-3731.
103. Loomes LM, Kerr MA, and Senior BW. The cleavage of immunoglobulin G *in vitro* and *in vivo* by a proteinase secreted by the urinary tract pathogen *Proteus mirabilis*. *J. Med Microbiol.* 1993; 39: 225–232.
104. Jansen H-J, Grenier D, and Van der Hoeven AJ. Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol. Immunol.* 1995; 10: 138–145.
105. Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, Matsumoto H, Maeda H, and Hagihara Y. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun.* 1995; 63: 984–988.
106. Chen LC, Blank ES, Casadevall A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996; 3: 570–4.
107. Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boer S, Wright JR & Heitman J. Spore as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009; 77(10): 4345-55.
108. Campbell GD. Primary pulmonary cryptococcosis. *Am Rev Respir Dis.* 1996; 94: 236-243.
109. Aberg JA, Mundy LM, Powderly WG. Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV. *Chest.* 1999; 115: 734-740.

110. Barbosa ATF, Colares FA, Gusmão ES, Barros AA, Cordeiro CG, Andrade MCT. Criptococose Pulmonar isolada em paciente imunocompetente. J Bras Pneumol. 2006; 32(5):476-480.
111. Moretti ML, Resende MR, Lazéra MS, Colombo AL, Yasuda MAS. Consenso em Criptococose. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41(5): 524-544.
112. Leimann BCQ & Koifman RJ. Cryptococcal meningitis in Rio de Janeiro State, Brazil, 1994-2004. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2008; 24(11): 25882-2592.
113. Rozenbaum R, Gonçalves AR. Clinical epidemiological study of 171 cases of Cryptococcosis. Clin Infect Dis. 1994; 18: 369-380.
114. Severo LC, Berta e Zardo I, Londero AT. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Rev. Iberoam Micol. 2001; 18: 200-201.
115. Kumar P, Saran RK, Gondal R, Malhotra V. Smear morphology of cryptococcosis presenting as a subcutaneous swelling in healthy adults: a report of three cases. Cytopathology. 2005; 16:143-146.
116. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989, New York.
117. Spitzer ED and Spitzer SG. Use of a dispersed repetitive DNA element to distinguish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 1094-1097.
118. Varma A, Kwon-Chung KJ. DNA probe for strain typing of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 1992; 30: 2960-2967.
119. Mullis KB, Ferré F, Gibbs RA. PCR - The polymerase chain reaction. TIG. 1995; 11: 249.
120. Rappelli P, Are R, Casu G, Fiori P L, Cappuccinelli P, Aceti A. Development of a nested PCR for detection of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1998; 36: 3438-3440.
121. Leal AL, Faganello J, Bassanesi MC and, Vainstein MH 2008. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. Med. Mycol. 2008; 46: 377-383.
122. Hafner C, Linde HJ, Vogt T, Breindl G, Tintelnot K, Koellner K, Landthaler M. and Szeimies RM. Primary cutaneous cryptococcosis and secondary antigenemia in a patient with long-term corticosteroid therapy. Infection. 2005; 33: 86-89.
123. Levy PY, Raoult D, Rolain J M, Reynaud-Gaubert G M, Habib G. Pericardial effusion due to *Cryptococcus neoformans* in a patient with cystic fibrosis following lung transplantation. Int. j. infect. dis. 2008; 12: 452.

124. Enanche-Angoulvant A, Chandenier J, Symoens F, Lacube P, Bolognini J, Douchet C, Poirot JL and Hennequin C. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. J Clin Microbiol. 2007; 45: 1261-1265.
125. Capoor MR, Nair D, Deb M, Gupta B, Aggarwal P. Clinical and mycological profile of cryptococcosis in a tertiary care hospital. Indian Journal of medical Microbiology. 2007; 25: 401-404.
126. Chen J, Varma A, Diaz Mr, Litvintseva A P, Wollenberg K K, Kwon-Chung K . *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. Emerging Infectious Diseases. 2008; 14:755-762.
127. Sorrell TC, Chen SC, Ruma P, Meyer W, Pfeiffer TJ, Ellis DH and Brownlee AG. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 1996; 34: 1253-1260.
128. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ and Meyer W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc. Natl. Acad. Sci. 2004; 101: 17258-17263.
129. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WCJ, Abeln ECA, Dromer F and Meyer W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology. 2001; 147: 891-907.
130. Latouche GN, Huynh M, Sorrell TC and Meyer W. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Phospholipase B (*PLB1*) Gene for Subtyping of *Cryptococcus neoformans* Isolates. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69:2080-2086.
131. Nosanchuk JD, Shoham S, Fries BC, Shapiro DS, Levitz SM and Casadevall A. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. Ann. Intern. Med. 2000; 132: 205-208.
132. Mueller UG and Wolfenbarger LL. AFLP genotyping and fingerprinting. Trends Ecol. Evol. 1999; 14: 389-394.
133. Panneerchelvam S. and Norazmi MN Forensic DNA profiling and database. Malays. J. Med. Sci. 2003; 10: 20-26.
134. Wengenack NL and Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. Clin. Chest. Med. 2009; 30: 391-408.
135. Huston SM & Mody CH. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. Clin Chest Med. 2009; 30: 253-264.
136. Gundes SG, Gulenc S, Bingol R. Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C AUX systems in the identification of clinically significant yeasts. J Med Microbiol. 2001; 50:1105-1110.

137. Massonet C, Eldere JV, Vaneechoutte M, Baere T, Verhaegen J, Lagrou K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-Fragment Length Polymorphism Analysis for identification of yeast species. J Clin Microbiol. 2004; 42: 2209-2211.
138. Paschoal RC, Hirata MH, Hirata RC, Melhem MSC, Dias ALT and Paula CR. Neurocryptococcosis: diagnosis by PCR method. Rev Inst Med trop Sao Paulo. 2004; 46: 203-207.
139. Bovers M, Diaz MR, Hagen F, Spanjaard L, Duim B, Visser CE, Oogveld HL, Scharringa J, Hoepelman IM, Fell JW and Boekhout T. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. J. Clin. Microbiol. 2007; 45:1874-1883.
140. Magee PT, Gale C, Berman J. and Davis D. Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. Infect. Immun. 2003; 71: 2299-2309.
141. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara J. and Chang TC. Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol. 2006; 44: 693-699.
142. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic Medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C). J Clin Microbiol. 1982; 15(3): 535-537.
143. Poeta, MD, Toffaletti DL, Rude TH, Dykstra CC, Heitman J, Perfect JR. Topoisomerase I is essential in *Cryptococcus neoformans*: role in pathobiology and as an antifungal target. Genetics. 1999; 152: 167-178.
144. Aoki FH, Imai T, Tanaka R, Mikami Y, Taguchi H, Nishimura NF, Nishimura K, Miyaji M, Schreiber AZ, Branchini MLM. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of Random Amplified Polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. J Clin Microbiol. 1999; 37(2): 315-320.
145. Horta J A, Staats CC, Casali AK, Ribeiro AM, Schrank I S, Schrank A, Vainstein MH. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. Med Mycol. 2002; 40: 565-571.
146. Kao, CJ & Schwarz J. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon nests. Amer J Clin Path. 1957; 27:652-663.
147. Littman ML & Schneierson SS. *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. Amer. J. Hyg.1959; 69: 49-59.
148. Emmons CW. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitat. Public Health Rep. 1960; 75: 362-364.
149. Silva ME. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* e *Microsporium gypseum* em solos da Bahia, Brasil. Bol. Fund. G. Muniz, 1960; 17: 1-14.

150. Machado CC, Amaral AA, Severo LC. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. Rev Inst Med trop São Paulo. 1993; 35(1): 77-79.
151. Silva ME, Paula LA. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excrementos e ninhos de pombos (*Columba livia*) em Salvador, Bahia. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 1963; 5(1):9-11.
152. Nigro NTMRC, Pereira AD, Huggins DW, Lacaz CS. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos, do solo e ninhos de pombos. Rev Bras Med. 1987; 44 (1 e 2): 6-9.
153. Casali AK, Staats CC, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares e epidemiológicos. Biotecnologia Cienc Desenvolv. 2001; 20: 34-37.
154. Kobayashi CCBA, Hasimoto e Souza LK, Fernandes OFL, Brito SCA, Silva AC, Sousa ED, Silva MRR. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. Rev Inst Med trop São Paulo. 2005; 7(4): 203-207.
155. Silva JO, Capuano DM. Occurrence of *Cryptococcus* spp and paraistes of interest in public health in pigeons excrement in the city of Ribeirão Preto, SP, Brazil. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2008; 67(2):137-141.
156. Faria RO, Nascente PS, Meinerz ARM, Cleff MB, Antunes TA, Silveira ES et al . Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2010; 43(2): 198-200.
157. Bulmer GS. Twenty-five years with *Cryptococcus neoformans*. Mycopahtologia. 1990; 109:111-122.
158. Krockenberger MB, Canfield PJ, Malik R. *Cryptococcus neoformans* in the koala (*Phascolartus cinereus*): colonization by C. n. var. *gattii* and investigation of environmental sources. Med. Micol. 2002; 49: 263-272.
159. Lopez-Martinez R, Castanon-Olivares LR. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from bird dropping, fruits and vegetables in Mexico City. Mycopathologia. 1995; 129: 25-28.
160. Granados DP & Castañeda E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992-2004. FEMS Yeast Res. 2006; 6: 636-644.
161. Pedroso RS. *Cryptococcus* spp de fontes ambientais em Ribeirão Preto: ocorrência, fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos. [Dissertação de Mestrado], Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP; 2004.120 p. Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
162. 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. S. Paulo. 2005; 47(1): 31-36.

163. Yildiran ST, Saracli MA, Gönülün A, Gün H. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* from pigeon droppings collected throughout Turkey. *Med Mycol.* 1998; 36:391-394.
164. Zarrin M, Jorfi M, Amirrajab N, Rostami M. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings in Ahwaz, Iran. *Turk J Med Sci.* 2010; 40(2): 313-316.

## 9. Anexos

### Meios de Cultura e Reagentes

#### 1- ÁGAR STAIB (NÍGER SEED AGAR/NSA) – 1L

- Cozinhar 100g de semente de Níger em 500ml de água destilada por 30 minutos
- Esperar esfriar e bater no liquidificador
- Coar com auxílio de uma gaze
- Adicionar:
  - 20g de Agar-ágar
  - 400mg de cloranfenicol
  - 800µL de amicacina (opcional)
  - Completar o volume para 1L com água destilada
- Transferir para balão de 2L
- Autoclavar por 15 minutos a 121°C
- Distribuir em placas de petri estéril em fluxo laminar

#### 2- MEIO CGB (CANAVANINA GLICINA AZUL DE BROMOTIMOL) – 250mL

##### 2.1- SOLUÇÃO A (100 mL)

- 30mg L-canavanina
- 10g glicina
- 1g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1g  $7\text{H}_2\text{OMgSO}_4$
- 1mg tiamina

- Completar o volume para 100mL com água Milli Q
- Verificar pH da solução e corrigir, se necessário, com NaOH 1M
- O pH final deverá ser 5.8, sendo aceitável variação até  $\pm 0,1$
- Esterelizar por filtração utilizando membrana 0,22  $\mu\text{m}$
- Fazer alíquotas de 25mL
- Armazenar em freezer -20°C

## 2.2- SOLUÇÃO B – Sol. de Azul De Bromotimol Sódico 0,4% (100 mL)

- 0,4g Azul de bromotimol sódico
- Completar o volume para 100mL com água Milli Q
- Homogeneizar
- Verificar pH da solução e corrigir, se necessário, com NaOH 1M
- O pH final deverá ser 5.8, sendo aceitável variação até  $\pm 0,1$
- Colocar a solução em frasco âmbar
- Armazenar em geladeira (+2 a +8°C)

## 2.3- Produção final do Meio CGB (250mL)

- Retirar do freezer a solução A (25mL), caso congelada, e deixar descongelar em temperatura ambiente.
- 5g ágar-ágar
- 5mL da solução B
- Completar o volume para 220mL com água Milli Q
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos
- Resfriar  $\pm 55^\circ\text{C}$
- Acrescentar ao meio 25mL da solução A lentamente, homogeneizando bem
- Distribuir 2,5mL em tubos de ensaio estéreis 13x100mm com tampa de rosca
- Inclinar

## 3 – MEIO DE UREIA ( Urea Broth) – DIFCO

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Extrato de levedura .....   | 0,1 g  |
| Fosfato Monopotássico ..... | 9,1 g  |
| Fosfato Dipotássico .....   | 9,5 g  |
| Uréia .....                 | 20,0 g |
| Vermelho de Fenol .....     | 0,01 g |

Ph final: 6,8 0,1 g – Formulação para 1 g/L.

Dissolver 38,7 g em 1L.

### 3- SOLUÇÃO NaCl 0.9% (com cloranfenicol) - 1L

- 9g de NaCl
- 0,4g de cloranfenicol
- Autoclavar por 15 minutos a 121°C