

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**ISOLAMENTO AMBIENTAL E CARACTERIZAÇÃO**  
**BIOQUÍMICA DE *Cryptococcus***

**Mariana Malavazi Destro**

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP  
2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**ISOLAMENTO AMBIENTAL E CARACTERIZAÇÃO  
BIOQUÍMICA DE *Cryptococcus***

**Mariana Malavazi Destro**

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Marinho**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Regina Peiró**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP  
2016

Catálogo na Publicação(CIP)  
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Destro, Mariana Malavazi

D476i      Isolamento ambiental e caracterização bioquímica de *Cryptococcus*  
/ Mariana Malavazi Destro.  
Araçatuba: [s.n], 2016.  
38f. il.; CD-ROM

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Medicina Veterinária, 2016

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Marinho  
Coorientadora: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Regina Peiró

1. Análise ambiental. 2. criptococose. 3. diagnóstico. 4. micose sistêmica. I. T.

CDD 333.2

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO: Isolamento ambiental e caracterização bioquímica de *Cryptococcus*

---

---

**AUTORA: MARIANA MALVAZI DESTRO**

**ORIENTADORA: MARCIA MARINHO**

**COORDENADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL,  
área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARCIA MARINHO

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



Profa. Dra. LUZIA HELENA QUEIROZ

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



Dra. SIMONE BALDINI LUCHEIS

Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bauru/SP / Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA

Araçatuba, 03 de junho de 2016.

### **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARIANA MALAVAZI DESTRO** – nascida em 08 de fevereiro de 1988, em São Paulo - SP, cursou o ensino médio na Escola Agrícola ETE Paulo Ornellas Carvalho de Barros (Garça – SP) onde se formou em Técnica em Pecuária em 2005. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Paulista – UNIP, Campus de Bauru (2010). Pós-graduou-se em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais no Instituto Qualittas no ano de 2012. Iniciou no primeiro semestre de 2014 como aluna especial e, no segundo semestre como aluna regular do curso de mestrado em Ciência Animal na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – FMVA, na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, com bolsa de demanda social cedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

"Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela ciência, que  
faz arte em defesa da vida."

Carlos Chagas

"Não são as espécies mais fortes que sobrevivem, nem as mais  
inteligentes, e sim as mais suscetíveis a mudanças."

Charles Darwin

"O importante é não parar de questionar."

Albert Einstein

## DEDICATÓRIA

*“Aos Meus pais, que são exemplo de luta e dedicação.  
Minhas irmãs Giovana e Luciana por todo amor e apoio.  
Vó Maria por ser tão presente e tão especial.  
Amo vocês!”*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me deu forças e sabedoria durante toda esta caminhada.

Mãe e pai, vocês são o alicerce da minha vida. Obrigada pelos conselhos e puxões de orelha que me fizeram crescer e ver tudo de um modo sempre positivo. Obrigada pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Foram muitas as dificuldades, mas amor e colo nunca me faltaram. Amo vocês incondicionalmente!

Luck e Gigi, meus anjos, minhas irmãzinhas do coração... Como amo vocês! Somos amigas, confidentes, conselheiras, e sei que posso contar sempre com vocês. Obrigada por sempre estarem ao meu lado e me apoiar em todas as decisões. Nosso amor é além dessa vida.

Vó Maria, a senhora me ensinou tantas coisas... Ser uma pessoa boa, aprender a dividir e agradecer, me divertir em todos os lugares, ser simples e que a família é o bem mais precioso que temos. Obrigada por estar ao meu lado e sempre me ajudar com os estudos. Te amo vuvó!

Meus cunhados Fernando e Wellington. Vocês não são os anjos da guarda só das minhas irmãs, mas são os meus também. Obrigada por todo carinho e toda ajuda que vocês sempre me deram. Que bom que vocês fazem parte da família.

Meus compadres e amigos Thaísa e Eric, vocês são extensão da minha família, meus irmãos de alma. Nunca imaginei ter amigos tão fiéis e presentes. Nossa amizade é muito especial! Amo vocês!

Vó Rosiris, tia Silvia, primos e primas, nossa família não teria sentido se vocês não fizessem parte dela. Amo cada um de vocês de um modo especial. Obrigada por tudo.

Professora Adjunto Márcia Marinho, agradeço pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho. Pela abertura de novos horizontes através de persistência, reflexão e amadurecimento. O aprendizado foi grande



durante o trabalho, refletindo no profissional e pessoal. Muito obrigada por tudo!

Cilene, você foi mais que uma amiga, foi um anjo. Deus me deu a oportunidade de conviver com uma pessoa tão doce e competente. Obrigada por tudo o que você fez por mim. O laboratório não é o mesmo sem você!

Alexandre José Teixeira e Vanessa de O. P. Santos, muito obrigada por toda a ajuda, amizade e longas conversas durante o mestrado!

Professores doutores Katia Denise Saraiva Bresciani, Luzia Helena Queiroz, Marcelo Vasconcelos Meireles, Simone Baldini Lucheis, Mário Jefferson Quirino Louzada, Elisa Helena Giglio Ponsano, Flavia Lombardi Lopes, Tereza Cristina Cardoso Silva, Juliana Regina Peiró. Muito obrigada pelo apoio e ensinamentos.

Amigos do Laboratório de Microbiologia da FMVA, Erivelto, Fábio, Natália, Gisele, Jefferson, Reinaldo, Ricardo, Haruê e Cyndi. Vocês são muito especiais. Obrigada por toda a ajuda, conselhos e amizade!

Aos estagiários da FATEC, Bruce, Fabiano, Luiz e Beatriz. Obrigada pelas risadas, amizade e ajuda no projeto.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-Unesp, por ter me acolhido e sido minha segunda casa no mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa do programa Demanda Social (DS).

Muito obrigada!!!

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1 Histórico.....	13
2.2 Etiologia e eco-epidemiologia.....	14
2.3 Morfologia e identificação.....	15
2.4 Patogênese.....	16
2.5 Manifestações clínicas.....	17
2.6 Diagnóstico.....	18
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 2 – Isolamento ambiental e caracterização bioquímica de <i>Cryptococcus</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>34</b>
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>

## ISOLAMENTO AMBIENTAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE *Cryptococcus*

**RESUMO** - A criptococose é uma infecção fúngica causada por levedura do gênero *Cryptococcus*. Dentre as principais micoses sistêmicas nas últimas décadas, a criptococose vem assumindo um relevante papel, com altos índices de morbidade e mortalidade principalmente em pacientes imunodeprimidos. O presente trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência de *Cryptococcus* spp. em amostras ambientais na área urbana de Bauru-SP, Brasil, estabelecendo os focos ambientais, com a finalidade de compreender a eco-epidemiologia do microrganismo. Cinquenta amostras ambientais de dez locais representativos foram processadas e semeadas em ágar semente de Níger (NSA) e Sabouraud. As colônias com características macro e micromorfológicas compatíveis com *Cryptococcus* foram submetidas a provas bioquímicas, sendo que 12/50 (24%) das amostras foram positivas para o gênero *Cryptococcus*. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que foram encontradas espécies causadoras de criptococose no município de Bauru, constituindo-se na existência de focos ambientais, com potencial patogênico para o homem e animais. A compreensão da eco-epidemiologia do *Cryptococcus* constitui em uma importante ferramenta na estratégia de medidas preventivas.

**Palavras-chave:** Análise ambiental, criptococose, diagnóstico, micose sistêmica

## ENVIRONMENTAL ISOLATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *Cryptococcus*

**ABSTRACT** - Cryptococcosis is a fungal infection caused by yeasts of the genus *Cryptococcus*. One of the main systemic mycoses in recent decades, has been assuming an important role, with high rates of morbidity and mortality especially in immunosuppressed patients. The present study aimed to verify the existence of *Cryptococcus* spp. from environmental samples in the urban area of Bauru-SP, Brazil, establishing the environmental focus, with the purpose of understand the eco-epidemiology of the micro-organism. Fifty environmental samples from ten representative sites were processed and seeded in agar Niger seed (NSA) and Sabouraud. The colonies with macro and micromorphological compatible with *Cryptococcus* underwent biochemical tests, and 12/50 (24%) of the samples were positive for the genus *Cryptococcus*. From the results obtained, it can be concluded that species that cause cryptococcosis were found in the city of Bauru-SP, Brazil, constituting the existence of outbreaks with potential environmental pathogenic for human and animals. The eco-epidemiological understanding of the *Cryptococcus* constitutes an important tool in the strategy of preventive measures.

**Key words:** Cryptococcosis, diagnosis, environmental analysis, systemic mycosis

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica causada por um fungo basidiomiceto do gênero *Cryptococcus*. Embora existam mais de 39 espécies incluídas ao gênero, as leveduras patogênicas, responsáveis pela criptococose consistem basicamente de duas espécies: *C. neoformans* e *C. gattii*, que se diferem em aspectos bioquímicos, biológicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (QUEIROZ et al., 2008; SOTILLI et al., 2010).

Normalmente está associada a indivíduos com comprometimento imunológico, mas podendo ocorrer em organismos imunocompetentes (MALIK et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2005; PERFECT, 2006).

No ambiente, *C. neoformans* apresenta distribuição cosmopolita, associando-se normalmente a indivíduos com comprometimento imunológico, (MALIK et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2005; PERFECT, 2006), diferentemente do *C. gattii*, que encontra-se restrito à regiões de climas tropicais, subtropicais e em regiões temperadas da América do Norte (KIDD et al., 2007; LITVINTSEVA; MITCHELL, 2012).

No Brasil, a doença não é de notificação compulsória. Estima-se uma prevalência entre 8% a 12% em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana ocorrendo em todas as regiões do país, predominando a criptococose associada à AIDS, causada pelo *C. neoformans*, sendo a letalidade cerca de 35 a 40%. Enquanto que *C. gattii*, presente também em todo o território nacional, foi isolado de pacientes HIV negativos, provenientes das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, sem evidência de depressão imunológica (BRASIL, 2012).

Ambas as espécies de *Cryptococcus* são patógenos oportunistas colonizadores de frutas, mucosa oronasal, pele e unhas de animais e pessoas saudáveis, rins, linfonodos, baço, fígado, tireoide, adrenal, pâncreas, ossos, trato gastrointestinal, músculo, próstata, miocárdio e válvulas cardíacas e no

solo rico em excretas de aves (MALIK et al., 1997; MEDLEAU; BARSANTI, 1990; NELSON; COUTO, 2001).

Depois de inalado atinge os pulmões, mas por tropismo dirige-se para o Sistema Nervoso Central, onde desencadeia uma meningoencefalite devido à predileção pela dopamina (GOMPertz et al., 2008; QUEIROZ et al., 2008).

*C. neoformans* e *C. gattii* podem ser encontrados em uma variedade de nichos, incluindo substratos orgânicos, excretas de pombos (*Columbia livia domestica*) e de outras aves, fezes de morcegos, (ARAUJO JUNIOR et al., 2015; MARINHO et al., 2010; TENCATE, et al., 2012) e *habitats* relacionados como construções antigas, baratas, ninhos de vespa, suco de fruta fermentado, microbiota intestinal de cavalo, leite, cavidade nasal e pele de cães, gatos, coalas, recintos de coelhos, buracos de tatus, solo, vegetais em decomposição e ocos de várias espécies de árvores (CASADEVALL; PERFECT, 1998; LAZERA et al., 1993; LAZERA et al., 1996; LAZERA et al., 2000; MALIK et al., 1997; PAPPALARDO; MELHEM, 2003; TRILLES et al., 2003).

Nos últimos anos, observa-se o recrudescimento da criptococose afetando tanto homem como os animais, sendo considerada atualmente a doença com maior morbidade e mortalidade entre os pacientes soropositivos (QUEIROZ et al., 2008). Pelo exposto, a descoberta de focos ambientais podem ser de vital importância na compreensão da eco-epidemiologia do fungo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

Uma levedura capsular foi inicialmente descrita por Francesco Sanfelice, em 1894, na Itália, a partir do isolamento em suco fermentado de pêssego, sendo posteriormente, demonstrada sua patogenicidade experimentalmente em cães pelo próprio pesquisador (CORREA; CORREA, 1992).

A criptococose foi descrita como doença fúngica do homem por Otto Busse e Abraham Buschke, decorrente de um corpúsculo redondo-ovalado, causador de uma lesão de sarcoma na tíbia em uma paciente, sendo denominado inicialmente de *Saccharomyces hominis*. (CORREA; CORREA, 1992).

Em 1901, o micologista francês Jean-Paul Vuillemin considerou mais adequado enquadrar esta levedura no gênero *Cryptococcus*, com a denominação *C. neoformans* (LACAZ et al., 2002; LAZÉRA et al., 2000).

Hansemann (1905) descreveu o primeiro caso humano de meningoencefalite, caracterizada pela presença de lesões císticas gelatinosas, nas quais era visualizada a levedura. A partir de então, vários casos semelhantes foram descritos e Stoddard e Cutler (1916), nos Estados Unidos, denominaram o agente de *Torula histolytica*, gerando, portanto, grande confusão taxonômica (KWON-CHUNG et al., 1982).

Em 1934, foi comprovado que os dois patógenos consistiam de um único agente, sendo em 1950 denominado de *Cryptococcus neoformans*. Constituindo-se como uma levedura não contagiosa, subaguda a crônica, apresentando, comumente tropismo para o sistema nervoso e ou respiratório (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Gattii e Eeckels (1970) isolaram uma cepa de *Cryptococcus* proveniente de uma criança de sete anos, no Zaire, com sintomas de meningoencefalite, sendo, descrito como uma nova variedade, denominado de *C. neoformans* var. *gattii* (HEITMAN et al., 2011).

Em 2006, durante o 16º Congresso Internacional de Micologia Médica e Humana (ISHAM), ficou definido em consenso que essas duas variedades seriam espécies independentes: *C. neoformans* e *C. gattii* (LIN; HEITMAN, 2006)

## 2.2 Etiologia e eco-epidemiologia

A criptococose é uma infecção subaguda ou crônica, causada pelo *Cryptococcus*, cuja forma encapsulada encontra-se no meio ambiente, apresentando diâmetro de  $<1\mu\text{m}$ , fato este que favorece a sua penetração nos alvéolos pulmonares (GOMPertz et al., 2008; HAWKINS, 2010).

Dentro do gênero *Cryptococcus* existem aproximadamente 39 espécies descritas, porém *C. neoformans* e *C. gattii* destacam-se como os agentes etiológicos mais comuns da criptococose humana e animal (COSTA et al., 2009).

O *C. neoformans* tem distribuição mundial, sendo patogênico para indivíduos imunocomprometidos, correspondendo ao principal patógeno oportunista em pacientes com AIDS. A incidência da doença atingiu o pico nos Estados Unidos da América em 1990, quando, 65,5 infecções por milhão de pessoas no ano foram relatadas (MURRAY, 2006). Condições favoráveis ao crescimento abundante da levedura, no ambiente formam microfocos, relacionados a excreta de aves, poeira domiciliar e ocos e troncos de árvores (CONSENSO EM CRIPOCOCOSE, 2008).

A infecção por *C. gattii* ocorre em hospedeiros imunocompetentes sendo isolado do ambiente, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais, entretanto, as áreas de clima temperado devem ser incluídas em sua distribuição. Atualmente, diversas espécies de árvores tem se mostrado como reservatório da levedura (BALTAZAR; RIBEIRO, 2008; CONSENSO EM CRIPOCOCOSE, 2008). No Brasil, *C. gattii* confirma seu comportamento como patógeno primário, infectando indivíduos imunocompetentes nas regiões norte



e nordeste, com letalidade de 35 a 40% (CONSENSO DE CRIPTOCOCOSE, 2008; LAZÉRA et al., 2000; TRILLES et al., 2008).

Atualmente, *C. gattii*, tem sido encontrado em diferentes árvores e regiões geográficas do mundo, demonstrando que sua ocorrência não está estritamente associada a árvores de eucalipto e a climas tropicais e subtropicais, podendo ocorrer também em locais de clima temperado (BALTAZAR; RIBEIRO, 2008).

### 2.3 Morfologia e identificação

Em cultura no ágar Sabouraud, as espécies de *Cryptococcus* produzem colônias mucóides esbranquiçadas em 2 a 3 dias. Ao exame microscópico, são células esféricas com 4 a 8 µm de diâmetro circundadas por uma cápsula espessa polissacarídica que não sofre coloração. A cápsula é um marcador característico que pode ter um diâmetro até cinco vezes maior do que a célula fúngica. Normalmente formam-se brotamentos únicos, embora possam ser observados brotamentos múltiplos e cadeias de células em brotamento (JAWETZ et al., 1974; MITCHELL, 2012; MURRAY et al., 2006).

As espécies patogênicas de *Cryptococcus* são *C. neoformans* e *C. gattii*, que diferem das espécies não patogênicas de *Cryptococcus* pela capacidade de crescer a 37°C e pela produção de lacase, uma fenoloxidase que catalisa a formação de melanina a partir de extratos fenólicos apropriados. A melanina produzida por *Cryptococcus* foi descrita primeiro por Staib (1963), ao demonstrar que a pigmentação da colônia estava relacionada com o cultivo em extrato de sementes de *Guizotia abyssinica* (Níger) para alimentação de pássaros que contém compostos fenólicos. Todas as espécies de *Cryptococcus* possuem urease frente ao teste do Caldo Uréia (JAWETZ et al., 1974; MITCHELL, 2012; MURRAY et al., 2006).

Para diferenciar as espécies *C. gattii* e *C. neoformans*, utiliza-se o teste CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol). *C. neoformans* é sensível a L-

canavanina, não assimilando a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, assim mantém a cor original do meio. Porém, a espécie *C. gattii* é resistente a L-canavanina, sendo então, capaz de crescer no meio utilizando a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, elevando o pH do meio e modificando a cor do indicador de pH, o azul de bromotimol, para azul cobalto ou azul esverdeado forte (KWON-CHUNG et al., 1982; MIN; KWON-CHUNG, 1986).

## 2.4 Patogênese

A criptococose é adquirida pela inalação de células de *Cryptococcus* que se encontram em aerossóis no meio ambiente. A disseminação subsequente a partir dos pulmões, geralmente para o SNC devido à predileção do agente pela dopamina, produz meningoencefalite em indivíduos suscetíveis. A criptococose cutânea primária é rara, e pode ocorrer por inoculação transcutânea (MURRAY et al., 2006).

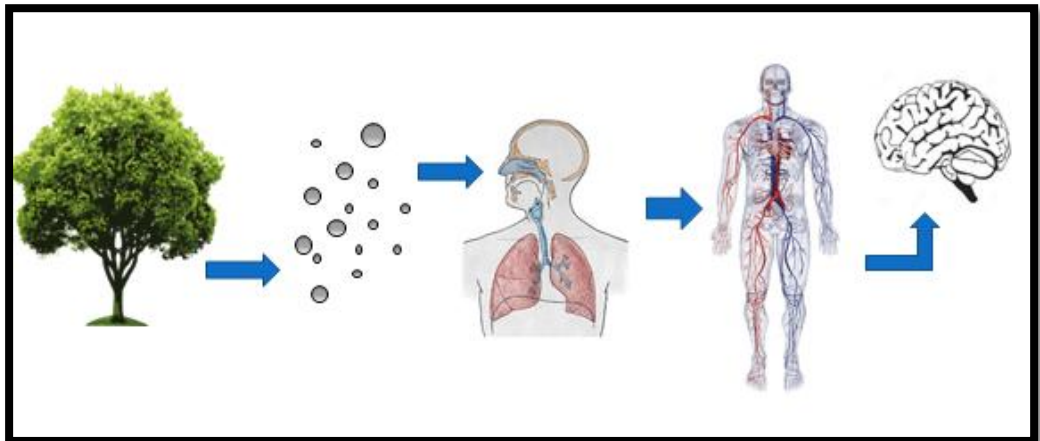


FIGURA 1 - Imagem do ciclo de infecção por *Cryptococcus* spp.

Fonte: Adaptado de Google Imagens.

Indivíduos com resposta imunológica incompleta não removem totalmente o microrganismo, resultando assim o desenvolvimento de lesões granulomatosas. A cápsula polissacarídica do *Cryptococcus* inibe a fagocitose, potencializando a infecção (LAPPIN, 2010).

Como principais fatores de virulência de *Cryptococcus*, podemos citar a cápsula, a fenoloxidase (produção de melanina) e a capacidade de crescer a 37°C. A cápsula protege a célula da fagocitose e de citocinas induzidas pelo processo fagocítico e suprime tanto a imunidade celular quanto humoral. O fungo produz melanina através de uma enzima fenoloxidase ligada a membrana e deposita na parede celular. Acredita-se que a melanina aprimora a integridade da parede celular, protegendo-a ainda mais contra a fagocitose (GOMPertz, 2008).

A injeção intraperitoneal ou intracerebral de *C. neoformans* em camundongos causa uma infecção fatal, da qual podem ser rescoladas os fungos, em cultura pura (JAWETZ et al., 1974; MITCHELL, 2012).

## **2.5 Manifestações clínicas**

A criptococose pode se manifestar em um processo pneumônico ou, mais frequentemente, como uma meningite crônica secundária à disseminação hematogênica e linfática a partir de um foco pulmonar primário. A meningite criptocócica pode assemelhar-se a um abscesso cerebral, doença degenerativa do SNC ou a qualquer meningite micobacteriana ou fúngica (MITCHELL, 2012; MURRAY, et al., 2006).

A criptococose é a infecção fúngica mais comum em gatos e deve ser considerada como diagnóstico diferencial para gatos com evidência clínica de doença do trato respiratório superior e inferior, nódulos subcutâneos, linfadenopatia, inflamação intraocular, febre ou doença do SNC. Gatos de todas as idades são infectados, mas os gatos mais jovens e que apresentam debilidade, desnutrição, uso prolongado de corticosteroides e infecções virais como aquelas causadas pelo vírus da imunodeficiência e da leucemia felina,

são mais suscetíveis (LAPPIN, 2010; MURRAY et al., 2006; QUEIROZ et al., 2008;).

A criptococose é diagnosticada mais comumente em cães jovens de raça pura e os achados clínicos em cães dependem dos sistemas orgânicos envolvidos, variando de infecção do trato respiratório superior ou inferior, doença disseminada, incluindo massas intra-abdominais, doença do SNC, doença da órbita ou do olho, lesões de pele, doença da cavidade nasal e envolvimento dos linfonodos. Convulsões, ataxia, síndrome vestibular central, déficits de nervos craniais e sinais clínicos de doença cerebelar são manifestações do SNC mais comuns em cães (LAPPIN, 2010).

## 2.6 Diagnóstico

O método mais indicado para o diagnóstico é a pesquisa do antígeno polissacarídico circulante no látex. Essa prova geralmente possui alta sensibilidade e especificidade. A aglutinação em látex (AL) é realizada no fluido cefalorraquidiano é positiva em quase todos os animais com criptococose no SNC. Para a microscopia direta, as amostras devem ser examinadas em preparações a fresco diretamente e após a mistura com tinta nanquim (tinta da Índia) ou outros corantes, que destaquem a cápsula (LEVINSON; JAWETZ, 2002; MITCHELL, 2012; MURRAY et al., 2006).

Verifica-se o crescimento de colônias em poucos dias na maioria dos meios de cultura, à temperatura ambiente ou a 37°C. Os meios que tem cicloheximida inibem *Cryptococcus*, devendo por isso ser evitados. As culturas podem ser identificadas pelo tempo de crescimento e por detecção da urease (MITCHELL, 2012).

Em meios de culturas com compostos fenólicos, *Cryptococcus* apresenta coloração marrom-escura a negra, devido à ação da fenoloxidase, o que não ocorre com outras espécies do mesmo gênero e com outras leveduras como *Candida albicans* (GOMPertz, et al., 2008).

O diagnóstico definitivo de criptococose baseia-se no resultado positivo do teste do antígeno ou na demonstração do organismo por citologia, histopatologia ou cultura, combinados com as manifestações apropriadas da doença (LAPPIN, 2010). A necrópsia pode fornecer dados complementares no diagnóstico dessa doença (QUEIROZ et al, 2008).

### **3 OBJETIVOS**

O presente trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência de *Cryptococcus* spp em amostras ambientais na área urbana de Bauru-SP, Brasil, estabelecendo os focos ambientais, com a finalidade de compreender a eco-epidemiologia do microrganismo.

#### 4 REFERÊNCIAS

ARAUJO JUNIOR, E.C.; TAPARO, C.V.; UCHIDA, C.Y. et al. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.67, n.4, p.1003-1008, 2015.

BALTAZAR, L. M.; RIBEIRO, M. A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 5, p.449-453, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e epidemiológica da Criptococose**. Brasília, DF: MS, 2012.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. ***Cryptococcus neoformans***. Washington, DC: American society for Microbiology Press, 1998. p. 541.

CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE. Relatório técnico. São Paulo: **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p. 524 - 44, 2008.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. São Paulo: MEDSI, 1992.

COSTA, S. P. S. E.; LAZERA, M. S; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. C. F.; NISHIKAWA, M.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L. M.; WANKE, B. First isolation *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* type VNI from environmental sources in the Belem City, Para, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 662-664, 2009.

FAVALESSA, O.C.; RIBEIRO, L.C.; TADANO, T. et al. Primeira descrição da caracterização fenotípica e susceptibilidade in vitro a drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp isoladas de pacientes HIV positivos e negativos, Estado de Mato Grosso. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.42, n.6, p.661-665, 2009.

GOMPertz, O.F.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CORRÊA, B. Micoses sistêmicas. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 521-523.

HAWKINS, E.C. Doenças da cavidade nasal. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna dos Pequenos Animais**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 226.

HEITMAN, J.; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. editors. (ed). *Cryptococcus*: from human pathogen to model yeast. Washington, DC: **American Society for Microbiology Press**, 2011. p. 646.

JAWETZ; MELNICK, ADELBERG. **Microbiologia Médica**. 10ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1974. p. 250-251.

KIDD, S.E.; CHOW, Y.; MAK, S. et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, n.5, p.1433-1443, 2007.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v.15, p. 535-537, 1982.

LAPPIN, M.R. Infecções micóticas Polissistêmicas. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna dos Pequenos Animais**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 1355-1357.

LAZERA, M. S. et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 34, n. 2, p. 127-131, 1996.



- LAZERA, M. S.; SALMITO-CAVALCANTI, M. A.; LONDERO, A. T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, p.379-383, 2000.
- LAZERA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 31, n. 6, p. 449-454, 1993.
- LEVINSON, W. JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 321-322.
- LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 69-105, 2006.
- LITVINTSEVA, A.P.; MITCHELL, T.G. Population genetic analyses reveal the African origin and strain variation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **PLoS Pathog**, v.8, n.2, p.e1002495, 2012.
- MALIK, R.; WIGNEY, D.I.; MUIR, D.B.; LOVE, D.N. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. **J. Med. Vet. Mycol.**, 35(1): 25-31, 1997.
- MARINHO, M. TAPARO, C.V.; SILVA, B.G.; TENCATE, L.N.; PERRI, S.H.V. Microbiota fúngica de passeriformes de cativos da região noroeste do Estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 2, p.288-292, 2010.
- MEDLEAU, L.; BARSANTI, J.A. 1990. Cryptococcosis. In: GREENE, C.E. **Infections Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: Saunders, 1990. p. 687-695.
- MIN, K.H.; KWON-CHUNG, K.J. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A:**

**Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology**, v. 261, n. 4, p. 471-480, 1986.

MITCHELL, T.G. Micologia Médica. In: JAWETZ; MELVICK; ADELBERG. **Microbiologia Médica**. 25ª ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2012. p. 649-651.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 700-701, 767-769.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Doenças micóticas polissistêmicas. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna dos Pequenos Animais**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 1023-1030.

OLIVEIRA, I.A.; NOBRE, M.O.; FERREIRO, L. Screening for *cryptococcus* in dogs referred to the Hospital de Clínicas Veterinárias of the UFRGS, Porto Alegre, Brasil. **Acta Scientiae Veterinarie**. v. 33, p. 253-258, 2005.

PAPPALARDO, M. C. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p.299-305, 2003.

PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 4, p. 463-468, 2006.

QUEIROZ, J.P.A.F.; SOUSA, F.D.N.; LAGE, R.A.; IZAEL, M.A.; SANTOS, dos, A.G. Criptococose – Uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinária Brasilica**, v.2, n.2, p.32-38, 2008.

SOTILLI, Joanine Andrighetti et al. Criptococcuria como manifestação de criptococose disseminada. **XI Salão de Iniciação Científica- PUCRS**, 09-12 de agosto de 2010.

TENCATE, L.N.; TAPARO, C.V.; CARVALHO, C.; BOSCO, S.M.G.; QUEIROZ, L.H.; SILVA, D.C.; PERRI, S.H.V.; MARINHO, M. Estudo da microbiota fúngica gastrointestinal de morcegos (Mammalia, Chiroptera) da região noroeste do

estado de São Paulo: potencial zoonótico. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 49, p.146-152, 2012.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; OLIVEIRA, R.V.; BARBOSA, G.G.; NISHIKAWA, M.M.; MORALES, B.P.; MEYER, W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.

## **CAPÍTULO 2 – ISOLAMENTO AMBIENTAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE *Cryptococcus***

**RESUMO** - A criptococose é uma infecção fúngica causada por levedura do gênero *Cryptococcus*. Dentre as principais micoses sistêmicas nas últimas décadas, a criptococose vem assumindo um relevante papel, com altos índices de morbidade e mortalidade principalmente em pacientes imunodeprimidos. O presente trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência de *Cryptococcus* spp em amostras ambientais na área urbana de Bauru-SP, Brasil, estabelecendo os focos ambientais, com a finalidade de compreender a eco-epidemiologia do microrganismo. Cinquenta amostras ambientais de dez locais representativos foram processadas e semeadas em ágar semente de Níger (NSA) e Sabouraud. As colônias com características macro e micromorfológicas compatíveis com *Cryptococcus* foram submetidas a provas bioquímicas, sendo que 12/50 (24%) das amostras foram positivas para o gênero *Cryptococcus*. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que foram encontradas espécies causadoras de criptococose no município de Bauru, constituindo-se na existência de focos ambientais, com potencial patogênico para o homem e animais. A compreensão da eco-epidemiológico do *Cryptococcus* constitui em uma importante ferramenta na estratégia de medidas preventivas.

**Palavras-chave:** Análise ambiental, criptococose, diagnóstico, micose sistêmica

## 1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção fúngica causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, que pode estar associada com a imunocompetência do hospedeiro (PERFECT, 2006). Dentre as principais micoses sistêmicas nas últimas décadas, a mortalidade é estimada em 10% nos países desenvolvidos e até 43% nos países em desenvolvimento (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; FAVALESSA et al., 2009).

Os propágulos do microrganismo dispersos no ambiente são resistentes as condições ambientais e permanecem viáveis por anos. Com sua inalação, se inicia o processo de infecção, que se manifesta principalmente como meningoencefalite devido à predileção do agente pela dopamina do sistema nervoso central (CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; LAZÉRA et al., 1998; LIN; HEITMAN, 2006; PERFECT, 2006; TELLO et al., 2013), afetando o homem e animais.

As espécies de importância clínica são *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que se diferem em aspectos bioquímicos, biológicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (QUEIROZ, et al., 2008).

A criptococose causada por *C. neoformans* consiste de uma enfermidade cosmopolita com distribuição relacionada a solos contaminados com excreta de aves. Afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos, em especial pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida- AIDS (LITVINTSEVA; MITCHELL, 2012; REOLON et al., 2004;). Em contrapartida, *C. gattii* causa uma infecção primária em indivíduos imunocompetentes, sendo encontrado até o momento em regiões com climas tropicais, subtropicais e em regiões temperadas da América do Norte (KIDD, et al., 2007; LITVINTSEVA; MITCHELL, 2012).

Os estudos ambientais no Brasil tiveram início na cidade do Rio de Janeiro, em zona urbana, onde as amostras foram provenientes de madeira em decomposição do interior das partes ocas de troncos das árvores (LAZÉRA et al., 1993). Passoni et al. (1998), analisaram 824 amostras, incluindo poeira

domiciliar, solo e excretas de aves no Rio de Janeiro, com *C. neoformans* sendo isolado em 20 (13%) das moradias. Eles isolaram *C. neoformans* em 15,6% (5/32) das residências de pacientes com criptococose associada a AIDS.

As diferentes características epidemiológicas do *Cryptococcus* fundamentam a necessidade de compreensão do seu habitat, frente às variações sazonais, à produção de propágulos infecciosos e as formas de transmissão, acarretando, conseqüentemente em estratégias profiláticas de controle da infecção (RESTREPO et al., 2000).

O presente trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência de *Cryptococcus* spp em amostras ambientais na área urbana de Bauru-SP, Brasil, estabelecendo os focos ambientais com a finalidade de compreender a eco-epidemiologia do microrganismo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A abrangência do estudo compreendeu a área urbana da cidade de Bauru, São Paulo, localizada na região centro-oeste do estado, a qual segundo o censo de 2014 apresentava 364.562 habitantes. Possui clima tropical de altitude, com temperatura média anual de 22,6°C, temperatura média máxima de 26,3°C e média mínima de 19°C. Na vegetação original do município, predomina-se o cerrado e mata atlântica. Precipitações ficam na média máxima de janeiro em 286 mm e na média mínima de julho em 33 mm (PREFEITURA MUNICIPAL DE BAURU, 2015).

No período de outubro de 2014 a janeiro de 2015, foram coletadas 50 amostras de 10 locais do perímetro urbano da cidade de Bauru, São Paulo (Figura 2), selecionados por serem arborizados e apresentar expressiva circulação de pessoas e animais.

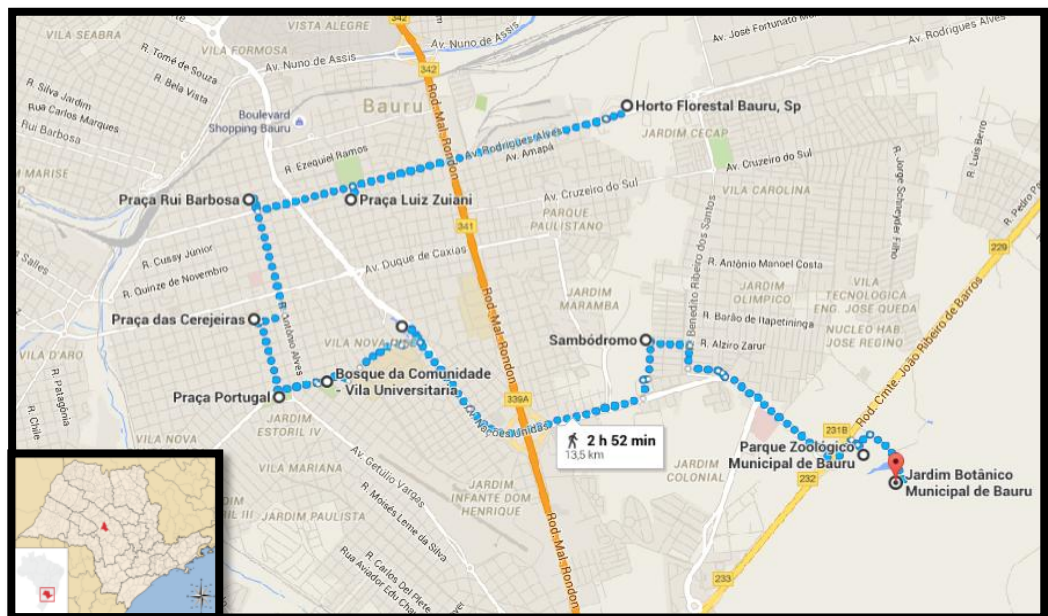


FIGURA 2 - Locais de coleta do perímetro urbano do município de Bauru, São Paulo, Brasil, 2015.

Fonte: Adaptado de Google Imagens.

As amostras foram provenientes de fragmentos de troncos e ocos de quatro espécies de árvores (*Caesalpinia pluviosa* sin. *C. peltophoroides*, *C. echinata*, *Eucalyptus* spp, *Ficus elastica*) sem a presença de contaminantes como excretas de aves ou líquen. Foram coletadas com auxílio de cureta estéril e EPIs necessários (luva, máscara, óculos de proteção e jaleco), sendo armazenadas individualmente em coletores universais estéreis.

No laboratório as amostras foram processadas conforme a metodologia de Araújo Júnior (2015). A semeadura foi realizada em meios de cultura de ágar semente de Níger e Sabouraud dextrose 2% com cloranfenicol, com incubação a 30°C e ambiente, respectivamente, por um período não inferior a cinco dias. A leitura ocorreu duas vezes ao dia e os repiques foram realizados conforme necessário, para obtenção de isolados puros e exuberantes.

As colônias sugestivas para *Cryptococcus* que apresentaram coloração marrom-escura em ágar Níger e crescimento mucoso com pigmentação variando de bege a acastanhada em ágar Sabourand, foram submetidas a coloração com tinta nanquim para confirmar a presença da cápsula, e lactofenol-azul-algodão para análise das características micromorfológicas.

As colônias identificadas e sugestivas para o gênero *Cryptococcus* foram submetidas a testes bioquímicos: Termotolerância, quando as amostras foram repicadas em ágar Sabouraud, e mantidas a 37°C em estufa bacteriológica por um período não inferior a sete dias; Caldo Uréia (Christensen, 1946); e ágar CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol) (MIN; KWON-CHUNG, 1986), para diferenciação entre as espécies de *C. gattii* e *C. neoformans*.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados revelaram que das 50 amostras coletadas, 12 (24%) foram positivas para o gênero *Cryptococcus*, sendo seis (12%) para *C. neoformans* e seis (12%) para *C. gattii*. Outras leveduras como *Rhodotorula* sp. e *Candida* sp., e fungos filamentosos como *Fusarium* sp. também foram isolados.

Todas as amostras coletadas apresentaram crescimento para uma única espécie de *Cryptococcus*, diferentemente do relato de Araujo Junior, et al. (2015), que encontraram *C. gattii* e *C. neoformans* na mesma amostra analisada. Os locais onde *C. gattii* foram encontrados eram parques onde predominam área de preservação com matas nativas, já *C. neoformans* foi isolado em praças, locais com maior atividade antrópica.

O clima e a temperatura da cidade de Bauru demonstraram-se ideais para o isolamento do *Cryptococcus*, diferentemente de Baltazar e Ribeiro (2008), os quais descrevem as condições climáticas de Vitória, cidade litorânea com temperaturas médias elevadas, pouco sombreamento e mata não nativa como não propícia para a ocorrência do fungo.

A realização do estudo durante o período da primavera e verão foi devido à influência da temperatura e umidade, que se demonstram ideal para o isolamento ambiental do fungo (ARAUJO JUNIOR et al., 2015; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008).

Dentre os locais de coleta das amostras, metade (5/10) se mostraram favoráveis para focos ambientais do gênero *Cryptococcus*, como demonstrado na Figura 3.

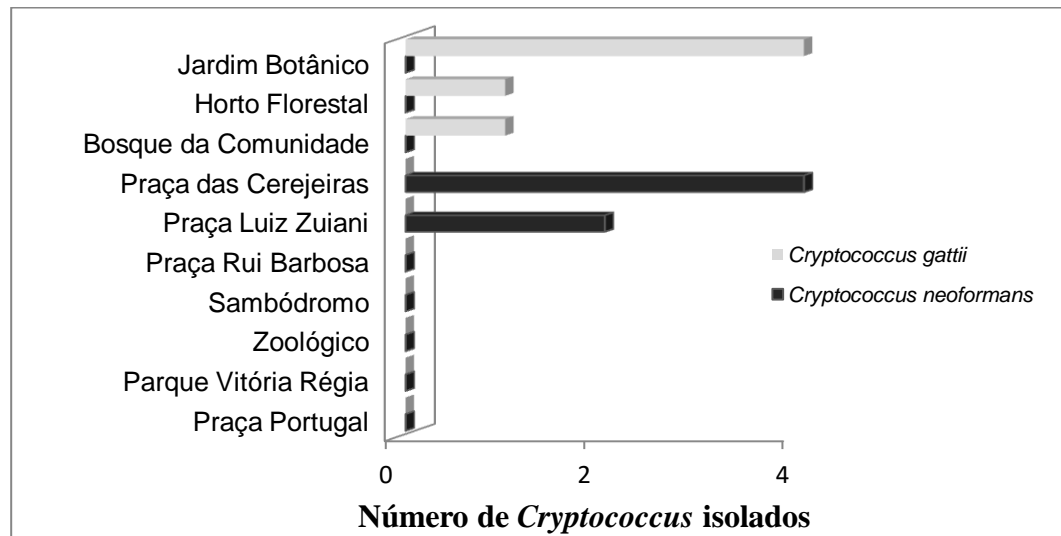


Figura 3 - Leveduras do gênero *Cryptococcus* spp isoladas de pontos estratégicos da cidade de Bauru, São Paulo, 2015.

Além de árvores, outros nichos de *Cryptococcus* spp no ambiente também estão sendo detectados, como o achado deste gênero em excrementos de pássaros psitacídeos de cativeiro e de solo contaminado com excreta de aves (ABEGG et al., 2006; CURRIE et al., 1994; YAMAMURA et al., 2013).

Em todas as espécies de árvores do estudo foram encontrados *Cryptococcus* spp, demonstrando serem focos ambientais em potencial. O papel das árvores, na dispersão de propágulos de *C. neoformans* pelo ar foi evidenciado por Lazéra et al. (2000). Os autores levantaram a hipótese de que o ar da entrada dos ocos de árvores poderiam dispersar os propágulos do fungo.

Por muito tempo o eucalipto (*E. camaldulensis*) foi associado como habitat natural específico para *C. gattii*, mas atualmente esta espécie tem sido encontrada em diferentes espécies de árvores, principalmente nativas, como *Ficus* sp, *Cassia* sp, *Senna* sp, *C. pluviosa* sin. *C. peltophoroides*, *Moquilea tomentosa* (ARAUJO JUNIOR, et al., 2015; CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE, 2008; LAZÉRA et al., 1998; RANDHAWA, et al., 2003).

Parques e praças são locais em potencial para o crescimento e manutenção do *Cryptococcus*. Por possuírem grande concentração de excretas e matéria orgânica, favorecem a disseminação da levedura, necessitando de medidas de controle e limpeza. Considerando-se que são locais visitados por indivíduos suscetíveis à infecção, existe grande relevância na cadeia epidemiológica.

Kobayashi et al. (2005) relataram a importância da identificação das fontes ambientais de *Cryptococcus* spp na investigação de fatores de risco à saúde pública.

## 4 CONCLUSÃO

*C. neoformans* e *C. gattii* encontram-se dispersos na área urbana da cidade de Bauru, São Paulo, constituindo em focos ambientais, com potencial patogênico para o homem e animais. O conhecimento da eco-epidemiologia do fungo, e conseqüentemente da distribuição e manutenção fúngica na natureza, contribui como importantes ferramentas para se elaborar estratégias preventivas a fim de minimizar possíveis infecções.

## 5 REFERÊNCIAS

ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v.161, p.83-91, 2006.

ARAÚJO JÚNIOR, E.C.; TÁPARO, C.V.; UCHIDA, C.Y. et al. *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.67, n.4, p.1003-1008, 2015.

BALTAZAR, L.M.; RIBEIRO, M.A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.41, n.5, p.449-453, 2008.

CHRISTENSEN, W. B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **J. Bacteriol.**, v.52, p.461-466, 1946.

CONSENSO EM CRIPTOCOCOSE. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.41, n.5, p.524-544, 2008.

CURRIE, B.P.; FREUNDLICH, L.F.; CASADEVALL, A. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.5, p.1188-1192, 1994.

FAVALESSA, O.C.; RIBEIRO, L.C.; TADANO, T. et al. Primeira descrição da caracterização fenotípica e susceptibilidade in vitro a drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp isoladas de pacientes HIV positivos e negativos, Estado de Mato Grosso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.42, n.6, p.661-665, 2009.

KIDD, S.E.; CHOW, Y.; MAK, S. et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British

Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, n.5, p.1433-1443, 2007.

KOBAYASHI C.C.B.A.; HASIMOTO E SOUZA L.K.; FERNANDES O.F.L. et al. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.47, n.4, p.203- 207, 2005.

LAZERA, M. S.; CAVALCANTI, M. S.; LONDERO, A. T. et al. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycology**, v.38, n.5, p.379-383, 2000.

LAZÉRA, M.S.; CAVALCANTI, M.A.; TRILLES, L. et al. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*--evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Med Mycol.**, v.36, n.2, p.119-22, 1998.

LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.31, p.449-454, 1993.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.60, p.69-105, 2006.

LITVINTSEVA, A.P.; MITCHELL, T.G. Population genetic analyses reveal the African origin and strain variation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **PLoS Pathog.**, v.8, n.2, p.e1002495, 2012.

MIN, K. H.; KWON-CHUNG, K. J. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology**, v.261, n.4, p.471-480, 1986.

PASSONI, L. F. C.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M.; et al. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: An

analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Med. Mycology**, v. 36, n. 5, p. 305-11, 1998.

PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Res.**, v.6, p.463-468, 2006.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE BAURU. Portal da prefeitura do município de Bauru. Disponível em: <http://www.bauru.sp.gov.br/> Acesso em: 02 mar. 2016.

QUEIROZ, J.P.A.F.; SOUSA, F.D.N.; LAGE, R.A. et al. Criptococose: uma revisão bibliográfica. **Acta Vet. Bras.**, v.2, p.32-8, 2008.

RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; KHAN. Z.U. Decayed wood of *Syzygium cumini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycol.**, v.41, p.199-209, 2003.

REOLON, A.; PEREZ, L.R.R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.40, n.5, p.293-298, 2004.

RESTREPO, A.; BAUMGARDNER, D. J.; BAGAGLI, E.; et al. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. **Med. Mycology**, Abingdon, v.38, p.167-177, 2000. Suplemento 1.

TELLO, M.; ERICSON, G.; VILMA, B. et al. Cryptococcosis. **Rev. Méd. Risaralda**, v.19, n.2, p.147-153, 2013.

YAMAMURA, A.A.M.; FREIRE, R.L.; YAMAMURA, M.H. et al. Estudo dos nichos ecológicos de leveduras patogênicas das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* na cidade de Londrina, PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.2, p.793-804, 2013.