

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

***CRYPTOCOCCUS*: ISOLAMENTO AMBIENTAL E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA**

Erivelto Corrêa de Araújo Junior
Médico Veterinário

ARAÇATUBA - SP
2014

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

***CRYPTOCOCCUS*: ISOLAMENTO AMBIENTAL E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA**

Erivelto Corrêa de Araújo Junior
Orientadora: Prof^a. Adj. Márcia Marinho

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

ARAÇATUBA – SP
2014

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

	Araújo Júnior, , Erivelto Corrêa de
A663c	Cryptococcus: isolamento ambiental e caracterização bioquímica / Erivelto Correa de Araújo Júnior. -- Araçatuba: [s.n], 2014. 52 f. il.; + CD-ROM Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014. Orientador: Profa. Dra. Marcia Marinho 1.Microbiologia. 2. Levedura. 3. Microfocus. 4.Árvore. I. T. CDD 579.0282

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Cryptococcus: Isolamento ambiental e caracterização bioquímica.

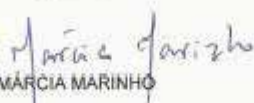
AUTOR: ERIVELTO CORRÊA DE ARAÚJO JÚNIOR

ORIENTADORA: Dra. MÁRCIA MARINHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (Ciência Animal) pela Comissão Examinadora.


Dra. LUZIA HELENA QUEIROZ


Dra. SIMONE BALDINI LUCHEIS


Dra. MÁRCIA MARINHO

DATA DA REALIZAÇÃO: 3 de fevereiro de 2014.



Presidente da Comissão Examinadora
Dra. MÁRCIA MARINHO
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Erivelto Corrêa de Araújo Junior - nascido em 08 de janeiro de 1987 na cidade de Araçatuba - SP, graduado em Medicina Veterinária pelas Faculdades Adamantinenses Integradas, FAI, em 2010. Foi contratado em fevereiro de 2011 pela Prefeitura Municipal de Araçatuba como Médico Veterinário Responsável Técnico do Centro de Controle de Zoonoses, cargo no qual permaneceu até dezembro do mesmo ano. Ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal em 06 de agosto de 2012 e foi efetivado como Médico Veterinário da Prefeitura Municipal de Santópolis do Aguapeí/SP por meio de concurso público em janeiro de 2014, cargo que ocupa atualmente.

DEDICATÓRIA

"Aos meus pais, Erivelto e Maria Helena, pelo exemplo de luta, pela educação, por terem me ensinado os verdadeiros valores e por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões acadêmicas e profissionais. Às minhas irmãs, Tici e Nara, pelo apoio e incentivo, e a todos meus familiares pelas energias positivas.

À Catia, minha namorada, pelo respeito, pelo amor, compreensão e por estar sempre ao meu lado.

Àqueles que já interpretam que a caridade e amor não é só entre nós humanos e sim para tudo o que foi criado por Deus".

AGRADECIMENTOS

Ao criador de todo o Universo e todas as coisas, DEUS nosso Pai e ao meu anjo da guarda.

À Professora Adjunto Márcia Marinho:

Pela profissional competente, professora experiente, com enorme capacidade de orientação, educadora exemplar e acima de tudo, pessoa valorosa, de conteúdo ético e exemplar que reflete seu ser e sua conduta.

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.

À funcionária do Laboratório de Bacteriologia e Micologia da FMVA - Unesp - Cilene Vidovix Táparo pela amizade, aprendizado e colaboração na execução do trabalho.

Às estagiárias Cyndi e Mariana que ajudaram como puderam, conforme o tempo disponível.

Às novas amigas que construí ao longo do Programa de Pós-Graduação.

Aos amigos para todos os momentos: Marcel, David, Iderlipes, Thiago e Luiz, obrigado pelas contribuições durante todo o Mestrado.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, em nome de todos os professores e funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse objetivo.

MUITO OBRIGADO!!

"Parece sempre impossível até que seja feito"

(Nelson Mandela)

***"O primeiro passo para chegar em algum lugar é
decidir que você não quer ficar mais onde está"***

(autor desconhecido)

CRYPTOCOCCUS: ISOLAMENTO AMBIENTAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

RESUMO: O gênero *Cryptococcus*, caracteriza-se por ser uma levedura, responsável por infecção sistêmica, causada pelas espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, podendo estar associado à imunossupressão ou não do hospedeiro. O fungo é encontrado em substratos de origem animal e vegetal, e a infecção ocorre a partir da inalação de basidiósporos ou leveduras desidratadas infectantes presentes no ambiente. O presente trabalho teve por objetivo pesquisar a existência de microfocos de *Cryptococcus* sp. a partir de amostras ambientais da cidade de Araçatuba, São Paulo, com a finalidade de minimizar os riscos de contaminação do homem e dos animais, buscando o conhecimento da ecoepidemiologia do *Cryptococcus*. Foram colhidas 50 amostras oriundas de ocos e troncos de árvores (*Cassia* sp., *Ficus* sp. e *Caesalpineia peltophorides*) de dez locais representativos do perímetro urbano, e imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia e Micologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-Unesp; onde foram processadas e semeadas em placas de Petri contendo ágar semente de Níger e Sabouraud dextrose com clorafenicol e incubadas a temperatura de 30°C por um período não inferior há 5 dias. As colônias com crescimento leveduriformes foram analisadas considerando-se as características macro e micromorfológicas, compatíveis ao gênero *Cryptococcus*. Posteriormente foram novamente repicadas em ágar Níger, cultivadas em tempo e temperatura supracitadas e submetidas às provas bioquímicas: produção de urease, termotolerância à 37°C e quimiotipagem em ágar CGB (L-Canavanina, Glinica, Azul de Bromotimol). A análise dos resultados revelaram que 17 (34%) dos cultivos foram positivos para o gênero *Cryptococcus*, sendo que 9 (18%) foram de *Cryptococcus gattii* e 8 (16%) para *Cryptococcus neoformans*. Outras leveduras correlacionadas como *Rhodotorula* sp. e *Candida* sp. também foram isoladas. Pelo exposto, concluímos que os basidiósporos de *Cryptococcus* encontram-se dispersos na

natureza constituindo microfocos ambientais, não estando vinculado necessariamente a um único hospedeiro.

Palavras-chaves: Árvore, Levedura, Microbiologia, Microfoco.

CRYPTOCOCCUS: ENVIRONMENTAL ISOLATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION

SUMMARY: Cryptococcosis is an opportunistic fungal infection caused by *Cryptococcus* yeasts, especially *C. neoformans* and *Cryptococcus gattii*, which may be associated with immunosuppression or not. The fungus is found in substrates of animal and vegetable origin, and infection occurs through inhalation and seedlings present in the environment. The present study aimed to investigate the existence of microfocus *Cryptococcus* sp. from the environmental samples Araçatuba city, São Paulo, featuring new niches, by decoupling the direct relationship between fungus and host. In order to minimize the risk of contamination of man and animals, understanding the ecoepidemiology of *Cryptococcus*. Samples 50 originated from hollow logs and trees (*Cassia* sp., *Ficus* sp. and *Caesalpineia peltophorides*) of ten point the urban perimeter points. The samples were immediately sent to the Laboratory of Bacteriology and Mycology, Faculty of Veterinary Medicine Araçatuba - Unesp where they were processed and plated on Petri dishes containing agar seed Niger and Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol, incubated at 30°C for a period not less than 5 days. Colonies yeast growth were analyzed considering the macro and micro morphological compatible gender *Cryptococcus*, and later peaked in Niger agar, grown in time and above temperature and subjected to biochemical tests: urease production, thermotolerance at 37°C and quimiotipagem in CGB agar (L- Canavanine, Glinica bromothymol blue). The results showed that 17 (34%) cultures were positive for *Cryptococcus*, and 9 (18%) were *Cryptococcus gattii* and 8 (16%) for *Cryptococcus neoformans*. Other yeast correlated as *Rhodotorula* sp. and *Candida* sp. were isolated. For these reasons, we conclude that the infectious propagules of *Cryptococcus* are dispersed in nature constitute environmental microfocus, not necessarily being bound to a single host.

Keywords: Tree, Yeast, Microbiology, Microfocus.

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Histórico	16
2.2 Taxonomia.....	18
2.3 Agente etiológico.....	18
2.4 Aspectos Ecológicos.....	20
2.5 Aspectos Epidemiológicos	20
3 OBJETIVOS	22
4 REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO	29
RESUMO:	29
1 INTRODUÇÃO.....	31
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1 Determinação da área de coletas	33
2.2 Amostras	35
2.3 Cultivo microbiano	36
2.4 Isolamento e identificação	36
2.5 Hidrólise da uréia.....	36

2.6 Termotolerância a 37°C	37
2.7 Quimiotipagem	37
2.8 Análise Estatística	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4 CONCLUSÃO.....	46
5 REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A Criptococose também conhecida como Torulose, Blastomicose Européia, Doença de Busse-Buschke é uma micose sistêmica cuja porta de entrada é a via inalatória causada por um complexo de fungos patogênicos do gênero *Cryptococcus* (BRASIL, 2012). Dentre as micoses sistêmicas, a criptococose ganhou relevância pelo seu caráter de infecção oportunista, acometendo pacientes imunocomprometidos ou não (FILIÚ et al., 2002), e por ser uma zoonose com grande distribuição mundial (FERREIRA; RASO, 2012).

Atualmente cerca de 70 espécies de *Cryptococcus* são descritas, porém, para fins práticos, devem ser considerados patogênicos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, os quais destacam-se como os agentes etiológicos mais comuns da criptococose humana e animal, sendo mais raros os casos diagnosticados por outras espécies, como *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus albidus* (TAKAHARA, 2011; CARDOSO, 2012).

Cryptococcus neoformans acomete indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV - positivo); de 1980 a 2012, 6% dos casos notificados foram nesses pacientes. A segunda variedade, *gattii*, é endêmico nas regiões Norte e Nordeste e apresenta alta letalidade, entre 35% a 40% dos casos detectados. A doença não é de notificação compulsória, por isto os dados são dispersos e pouco confiáveis, o que inviabiliza estabelecer a magnitude real da doença no Brasil (BRASIL, 2012).

Na natureza, o *Cryptococcus* pode ser encontrado em uma variedade de nichos, incluindo substratos orgânicos e *habitats* relacionados a excretas de aves, fezes de morcegos, ninhos de vespa, frutas, suco de frutas fermentado,

solo naturalmente contaminado com as excretas, vegetais em decomposição e ocos e casca de várias espécies de árvores (REIMÃO et al., 2007; BALTAZAR; RIBEIRO, 2008; QUEIROZ et al., 2008).

A presença de *Cryptococcus neoformans* no solo e em excretas secas de pombos têm sido estudada em diversos países do mundo (EMMONS, 1960). Apesar do *Cryptococcus* spp. ser associado ao pombo, seu habitat primário pode ser considerado espécies de plantas e madeira envelhecidas, locais onde a levedura naturalmente desenvolve seu estado sexuado (PASSONI, 1999).

A associação saprofítica de *C. neoformans* com material vegetal em decomposição e em ocos de árvores vivas (REIS, 1998; RESTREPO et al., 2000, RIPPON, 1998; ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994), tem sido constantemente observado, constituindo um novo *habitat* natural para a espécie, indicando um possível nicho ecológico primário para o fungo (REIS, 1998). Fontes ambientais de *Cryptococcus* foram identificadas em árvores em diferentes partes do Brasil: Rio de Janeiro (RJ) (LAZERA et al., 1995), Teresina (PI) (LAZERA et al., 1998), Goiânia (GO) (KOBAYASHI et al., 2005) e na cidade de São Paulo (MONTENEGRO; PAULA, 2000). Esses achados, portanto, caracterizam um novo *habitat* natural para o micro-organismo, relacionando-o a madeira em decomposição, ou não, em diferentes árvores tropicais nativas ou introduzidas no Brasil (BRASIL, 2012), reafirmando a ocorrência do *Cryptococcus* no ambiente, dissociando-se da participação exclusiva do hospedeiro, no caso o pombo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A criptococose foi reconhecida como doença fúngica do homem por Otto Busse em 1894, por meio de um corpúsculo redondo-ovalado, causador de uma lesão na tíbia de uma paciente e denominado *Saccharomyces hominis*. No mesmo ano, Francesco Sanfelice isolou a mesma levedura encapsulada a partir de suco fermentado de pêssago. A seguir, este mesmo autor demonstrou experimentalmente a patogenicidade deste agente para cães (CORREA; CORREA, 1992).

Em 1895, Sanfelice foi o primeiro responsável pelo isolamento de *Cryptococcus* sp. em animais, a partir de linfonodos de um boi, e o chamou de *Torulopsis neoformans* (CORREA; CORREA, 1992).

Em 1901, Vuillerman e Klein isolaram o agente de uma lesão pulmonar em suínos (JUNGERMANS; SCHWARTZMAN, 1972), e denominou os isolados de Busse de *Cryptococcus hominis*, e o isolado de Sanfelice de *Cryptococcus neoformans*, já que os isolados não eram fermentativos e não formavam ascóporos, diferentes dos membros do gênero *Saccharomyces* (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Em 1934, foi comprovado que os dois eram um único agente, que, em 1950, recebeu o nome de *Cryptococcus neoformans*. Constituindo-se como uma levedura não-contagiosa, subaguda a crônica, comumente apresentando tropismo de sintomas nervosos ou respiratórios (CORRÊA; CORRÊA, 1992). A etimologia da palavra *Cryptococcus*, oriundo da palavra grega "*Kryptos*", significa "escondido", "secreto", "misterioso". Tal terminologia foi criada em 1833 por Kutzing (HEITMAN et al., 2011).

Os casos de criptococose em animais foram relatados esporadicamente até os anos 50. Somente em 1952 foi descrito o primeiro caso em gatos e no

ano seguinte o primeiro em cães. Nesta época, já se discutia a origem da infecção no Sistema Nervoso Central (SNC) de animais de companhia.

Os primeiros isolamentos de *C. neoformans* do ambiente foram realizados a partir de 1955, quando foram encontrados no solo e em excretas de aves, especialmente à excretas de pombos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Antes do início da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a criptococose era considerada uma doença esporádica, associada a deficiência na imunidade celular, ocorrendo num pequeno percentual da população (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). A partir dos anos 80, com a distribuição mundial da AIDS, bem como a utilização de medicamentos imunossupressores, houve um acréscimo na incidência da criptococose, sendo atualmente, a infecção fúngica de maior prevalência mundial (ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994; FRANZOT et al., 1997; CALVO et al., 2001; PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

Alguns estudos relataram que aves mantidas em cativeiro, especialmente, passeriformes e psitacíformes, podem ser responsáveis pela manutenção de *C. neoformans* no ambiente, favorecendo a proliferação da doença (FILIÚ et al., 2002; ABEGG et al., 2006).

A partir do primeiro isolamento de *Cryptococcus neoformans*, muitas pesquisas foram realizadas, no entanto ainda há muitos aspectos clínicos, epidemiológicos e ecológicos desconhecidos, em especial no Brasil. Quanto à epidemiologia do agente, ocorre grande heterogeneidade de distribuição dos sorotipos e variedade em diferentes países e regiões de um mesmo país (NISHIKAWA et al., 2003).

No Brasil, os primeiros relatos da doença ocorreram entre os anos de 1941 e 1944, descritos por Carlos da Silva Lacaz e Floriano de Almeida (PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

2.2 Taxonomia

Desde os primeiros achados de *Cryptococcus*, sua taxonomia vem sendo revisado. Segundo Kurtzman et al. (2011), o complexo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, segundo sua forma sexuada é classificada em Reino: *Fungi*, Filo: *Basidiomycota*, Ordem: *Filobasidiales*, Família: *Filobasidiaceae* e Gênero: *Cryptococcus*.

Atualmente, *C. neoformans* é representado como um complexo que compreende as espécies *Cryptococcus neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A) e *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), que provocam manifestações clínicas diversas. *Cryptococcus gattii* (sorotipo B e C) foi reconhecida como uma espécie distinta de *C. neoformans* devida suas diferenças morfológicas dos basidiósporos, nichos ambientais e características morfológicas in vivo e identidade molecular restrita (55 a 61% parentesco pelo DNA) (SPRINGER; CHATURVEDI, 2010).

O gênero apresenta 70 espécies, sendo apenas duas consideradas patogênicas, *C. neoformans* e *C. gattii* e as demais consideradas emergentes em pacientes imunodeprimidos: *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus humicola* e *Cryptococcus curvatus* (KURTZMAN et al., 2011).

2.3 Agente etiológico

São fungos leveduriformes que se apresentam de forma globosa ou ovalada, medem entre 2 a 4 µm de diâmetro e ao seu redor possui cápsula polissacarídica, a qual possibilita resistência à dessecação, além de ser um dos fatores de virulência do fungo (SANTILI, 2008) possibilitando vida intracelular e mecanismo de evasão à resposta imune celular (TAKAHARA, 2011).

A cápsula expressa pelo fungo *C. neoformans* é composta por galactoxilomana (GAIXM), 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 (VILLENA et al., 2008).

A diferença das estruturas das glicoronoxilomananas de sua parede celular, permitiu a identificação dos cinco sorotipos atualmente conhecidos A, B, C, D e AD (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

Apresenta-se de cor creme a marrom, brilhante, de textura mucóide, margem lisa e inteira, após três dias à temperatura de 25 a 37°C, em cultivo nos meios como ágar semente de Níger e ágar *Sabouraud* dextrose 4% (BRASIL, 2012).

A síntese de pigmentos de melanina a partir do fenol é específica de *C. neoformans* e *C. gattii* (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Meios contendo sementes de *níger* servem de substrato para a enzima fenoloxidase, que catalisa a oxidação de compostos O-difenólicos como L-dopa, L-dopamina, ácido clorogênico e ácido caféico, produzindo uma colônia marrom-escura ou negra em até cinco dias. Ocasionalmente, *C. luteolus*, *C. laurentii*, *C. terreus* e *C. albidus* podem desenvolver pigmentação mais clara em períodos de incubação prolongados (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; IKEDA et al., 2002).

A enzima lacase (fenol-oxidase) produz melanina através de auto polimerização, em meios contendo difenóis. A melanina é produzida através da PKA (proteína kinase A) e se deposita no interior da parede da levedura, possui característica da insolubilidade e da resistência a substâncias químicas e enzimas (TAKAHARA, 2011).

2.4 Aspectos Ecológicos

A variedade *neoformans* é cosmopolita, do ponto de vista epidemiológico e está relacionada a várias fontes ambientais como solo contaminados por excretas de aves, principalmente, pombos domésticos (REOLON et al., 2004; QUEIROZ et al., 2008; WERTHER et al., 2011), outras aves como passeriformes e psitacíformes (LUGARINI et al., 2007; MARINHO et al., 2010) árvores (BALTAZAR; RIBEIRO, 2008) e guano de morcegos (TENCATE et al., 2012), podendo se adaptar e viver saprofiticamente no organismo de humanos e dos animais domésticos (ELLIS; PFEIFFER, 1990). *C. gattii* é fonte primária de infecção de hospedeiro aparentemente imunocompetente, endêmica em áreas tropicais e subtropicais (PASSONI, 1999).

Cryptococcus gattii foi isolado pela primeira vez em restos vegetais de *Eucalyptus* spp. na Austrália, no entanto é frequentemente encontrando em diferentes espécies de árvores no Brasil, como *Cassia grandis*, *Senna multijuga*, *Ficus microcarpa*, *Syzygium jambolana*, *Theobroma cacao*, *Caesalpinia peltophorides*, não tendo um habitat natural específico e reafirmando a ocorrência em regiões brasileiras distintas, inclusive em árvores nativas da Floresta Atlântica e da Floresta Amazônica (BALTAZAR; RIBEIRO, 2008; BRASIL, 2012).

A criptococose é adquirida pela inalação de basidiósporos viáveis no ambiente, representados por leveduras desidratadas de locais com excretas contaminadas (DARZE et al., 2000).

2.5 Aspectos Epidemiológicos

A enfermidade, que é estudada há mais de cem anos (desde 1894) tem sido relatada como a de maior prevalente em termos de internação no Brasil segundo dados do Sistema Único de Saúde – SUS, no período de 2000 a 2007, totalizando 4.558 . Estima-se uma prevalência associada a AIDS entre

8% a 12% em centros de referência da região sudeste, perdendo apenas para a candidíase, (BRASIL, 2012). O agente etiológico da criptococose atinge pacientes imunodeprimidos (HIV - positivos) e imunocomprometidos por corticoterapia entre outras doenças (GARCIA, 2008; CONSENSO, 2008).

Ainda segundo dados BRASIL (2012) nas regiões norte e Nordeste do país predominam casos de criptococose em indivíduos sem evidências de imunossupressão, em ambos os sexos, HIV - negativos, causados pela variedade *gattii*, comportando-se como micose endêmica regional, com a ocorrência de meningoencefalite incluindo jovens e crianças, com elevada morbidade e letalidade (37 a 49%), revelando padrões regionais marcadamente distintos da criptococose var. *neoformans* predominante nas regiões Sudeste e Sul.

A infecção ocorre, geralmente, pela via aerógena, através da inalação do fungo, que se aloja primariamente nos pulmões (SCAIN, 2011).

Após a infecção, o *Cryptococcus* spp. pode espalhar-se através da corrente sanguínea ou linfática, tendo tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), manifestando normalmente meningite (CICHON et al., 2011; TAKAHARA et al.; 2011).



Figura 1. Imagem do ciclo de infecção por *Cryptococcus* spp. Fonte: www.bmolchem.wisc.edu

Pelo exposto, novos estudos devem ser realizados com o objetivo de obter uma melhor compreensão da ecoepidemiologia do fungo caracterizando novos nichos primários para o micro-organismo.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho visou investigar novos *habitats* para *Cryptococcus* sp. a partir de amostras ambientais do Município de Araçatuba, São Paulo, com objetivo de compreender melhor a ecoepidemiologia do micro-organismo e conhecer novos nichos ambientais do patógeno para que posteriormente, medidas preventivas possam ser elaboradas afim de minimizar os riscos de contaminação humana.

4 REFERÊNCIAS

- ABEGG, M. A.; CELLA, F. L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v. 161, p.83-91, 2006.
- 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.
- CALVO, M.B.; COLOMBO, A. L.; FISHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, M. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from

Brazil, Chile and Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2348-2350, 2001.

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

CARDOSO, P. H. M. **Classificação e perfil fenotípico de cepas clínicas e ambientais do complexo *Cryptococcus neoformans* mantidas em bancos de microrganismos**. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CICHON, M.; VICENTE, V. A.; MURO, M. D.; BORDIGNON, G. P. F.; QUEIROZ-TELLES, F. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de amostras ambientais de Curitiba e região metropolitana (Paraná, Brasil) e testes de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, p.176-179, 2011.

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.

DARZE, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 21-26, 2000.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 1642-1644, 1990.

EMMONS, C. W. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. **Public Health Reports**, v. 75, p. 362-364, 1960.

FERREIRA, V. L.; RASO, T. F. Survey of cryptococcal antigens in urban pigeons (*Columbia livia*) in São Paulo State, Brazil. **Journal of Poultry Science**, v. 11, p. 1-4, 2012.

FILIÚ, W. F. O.; WANKE, B.; AGÜENA, S. M.; VILELA, V. O.; MACEDO, R. C. L.; LAZÉRA, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 591-595, 2002.

FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S.; CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2243-2251, 1997.

GARCIA, L. C. **Estudo genotípico de *Cryptococcus neoformans* isolados de amostras ambientais no Município de Florianópolis, Santa Catarina. 2008. 40 f.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel) - Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

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.

IKEDA R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1214-1218, 2002.

JUNGERMAN, P. F.; SCHWARTZMAN, R. M. **Veterinary medical micology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1972.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; BRITO, S. L. A.; SILVA, A. C.; SOUSA, E. D.; SILVA, M. R. R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 7, p. 203-207, 2005.

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

KWON-CHUNG, K. J.; BENNET, J. E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Epidemiology**, v.120, p. 123-130, 1984.

LÁZERA, M. S.; CAVALCANTE, M. A.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Medical Mycology**, v. 36, p. 319 - 322, 1998.

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 Veterinary Mycology**, v. 31, p. 449-456, 1995.

LUGARINI, C. **Isolamento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de passeriformes e psittaciformes no estado do Paraná**. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MARINHO, M. TAPARO, C. V.; SILVA, B. G.; TENCATE, L. N.; PERRI, S. H. V. Microbiota fúngica de passeriformes de cativeiros da região noroeste do Estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 2, p.288-292, 2010.

MONTENEGRO, H.; PAULA, C. R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. **Medical Mycology**, v. 38, p. 385-390, 2000.

NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C.; BEZERRA, C. C.; PÉREZ, M. A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans*

isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 73-77, 2003.

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.

PASSONI, L. F. C. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 16, p. 77-81, 1999.

QUEIROZ, J. P. A. F.; SOUSA, F. D. N.; LAGE, R. A.; IZAEL, M. A.; SANTOS, A. G. Criptococose – uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinária Brasileira**, v.2, p. 32-8, 2008.

REIS, M. A. C. **Estudo clínico-epidemiológico de 23 casos de meningoencefalite criptocócica internados no Hospital da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul no período de outubro de 1994 a fevereiro de 1998**. Trabalho de conclusão do curso de Medicina. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 1998.

RESTREPO, A.; BAUMGARDNER, D. J.; BAGAGLI, E.; COOPER-JUNIOR, C. R.; MCGINNIS, M. R.; LAZERA, M. S. , BARBOSA, F. H.; BOSCO, S. M. G.; CAMARGO, Z. P.; COELHO, K. I. R.; FORTES, S. T.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; SANO, A.; WANKE, B. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. **Medical Mycology**, v. 38 (supl. 1), p. 67-77, 2000.

REOLON, A.; PEREZ, L. R. R.; MEZZARI, A. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in urban pigeons of Porto Alegre (RS), Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial**. v. 40, p. 293-298, 2004.

REIMÃO, J. Q.; DRUMMOND, E. D.; TERCETI, M. S.; LYON, J. P.; FRANCO, M. C.; SIQUEIRA, A. M. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brazil. **Mycoses**, v. 50, p. 261-264, 2007.

RIPPON, J. W. Medical mycology. In: RIPPON, J. W. **The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes**. New York: W. B. Saunders, 1988. p. 582-609.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A. J. R. Clinical epidemiological study of 171 cases cryptococcosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, p. 369-380, 1994.

SANTILLI, A. M. **Criptococose Óssea**: relato de caso. 2008. 31 f. Curso de Pós Graduação em clínica médica de pequenos animais, Departamento de Centro De Ciências Biológicas, Universidade Castelo Branco, São Paulo, 2008.

SCAIN, G. **Prevalência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos (*Columba livia*) nas praças públicas da cidade de Lages, Santa Catarina**. 2011. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Lages, 2011.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Diagnóstico laboratorial das leveduras. In: SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.76-89.

SPRINGER, D. J.; CHATUVERDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 16, p. 14-20, 2010.

STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection Journal**, v. 5, p. 667-675, 2003.

TAKAHARA, D. T. **Isolamento e identificação de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de pombos provenientes de locais públicos e residenciais de Cuiabá e Várzea Grande - MT**. 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Faculdade De Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

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 gastrintestinal 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.

VILLENA, S. N.; PINHEIRO, R. O.; PINHEIRO, C. S.; NUNES, M. P.; TAKIYA, C. M.; REIS, G. A.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; FREIRE-DE-LIMA, C. G. Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. **Cellular Microbiology**, v.10, p.1274-1285, 2008.

WERTHER, K.; SOUSA, E.; ALVES-JUNIOR, J. R. F.; ARDISSON, F. A.; GIANNINI, M. J. S. M. *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus albidus* in Captive Domestic Pigeon (*Columba livia*). **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v. 4, p.247-249, 2011.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO

CRYPTOCOCCUS: ISOLAMENTO AMBIENTAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

RESUMO: O gênero *Cryptococcus*, caracteriza-se por ser uma levedura, responsável por infecção sistêmica, causada pelas espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, podendo estar associado à imunossupressão ou não do hospedeiro. O fungo é encontrado em substratos de origem animal e vegetal, e a infecção ocorre a partir da inalação de basidiósporos ou leveduras desidratadas infectantes presentes no ambiente. O presente trabalho teve por objetivo pesquisar a existência de microfocos de *Cryptococcus* sp. a partir de amostras ambientais da cidade de Araçatuba, São Paulo, com a finalidade de minimizar os riscos de contaminação do homem e dos animais, buscando o conhecimento da ecoepidemiologia do *Cryptococcus*. Foram colhidas 50 amostras oriundas de ocos e troncos de árvores (*Cassia grandis*, *Ficus microcarpa* e *Ceasalpinea peltophorides*) de dez locais representativos do perímetro urbano, e imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia e Micologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-Unesp; onde foram processadas e semeadas em placas de Petri contendo ágar semente de Níger e Sabouraud dextrose com clorafenicol e incubadas a temperatura de 30°C por um período não inferior há 5 dias. As colônias com crescimento leveduriformes foram analisadas considerando-se as características macro e micromorfológicas, compatíveis ao gênero *Cryptococcus*. Posteriormente foram novamente repicadas em ágar Níger, cultivadas em tempo e temperatura supracitadas e submetidas às provas bioquímicas: produção de urease, termotolerância à 37°C e quimiotipagem em ágar CGB (L-Canavanina, Glinica, Azul de Bromotimol). A análise dos resultados revelaram que 17 (34%) dos cultivos foram positivos para o gênero *Cryptococcus*, sendo que 9 (18%) foram de *Cryptococcus gattii* e 8 (16%) para

Cryptococcus neoformans. Outras leveduras correlacionadas como *Rhodotorula* sp. e *Candida* sp. também foram isoladas. Pelo exposto, concluímos que os basidiósporos de *Cryptococcus* encontram-se dispersos na natureza constituindo microfocos ambientais, não estando vinculado necessariamente a um único hospedeiro.

Palavras-chaves: Árvore, Criptococose, Microbiologia Ambiental, Microfocos.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptococcus* caracteriza-se por leveduras encapsuladas que podem estar dispersas no ambiente, tendo como habitat natural lugares úmidos, alimentando-se de resíduos orgânicos, como excretas de pombos (RIBAS et al., 2011). A Criptococose é uma micose sistêmica cuja porta de entrada é via inalatória, causada por um complexo de fungos patogênicos do gênero *Cryptococcus*, que agride o homem e os animais (BRASIL, 2012), que ganhou relevância pelo seu caráter de infecção oportunista, acometendo pacientes imunocomprometidos ou não (FILIÚ et al., 2002), podendo levar ao desenvolvimento de dermatites, problemas respiratórios e nervosos (SILVA; CAPUANO, 2008), caracterizando-se como uma zoonose de grande distribuição mundial (FERREIRA; RASO, 2012).

O gênero *Cryptococcus* apresenta cerca de 70 espécies (KURTZMAN et al., 2011) e atualmente, duas destas espécies são reconhecidas como patogênicas: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A primeira inclui os sorotipos A (var. *grubii*), D (var. *neoformans*) e AD (híbrida entre var. *neoformans* e *C. gattii*), e a segunda os sorotipos (B e C) (RIBAS et al., 2011). As espécies e variedades se diferem em aspectos bioquímicos, biológicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (QUEIROZ et al., 2008). O *Cryptococcus neoformans* variedades A, D e AD, tem a capacidade de colonizar a mucosa do papo dos pombos, sem causar a doença, comportando-se como agente endosaprófito natural destas aves (FILIÚ et al., 2002). O *C. gattii* é frequentemente isolado a partir de plantas, como *Eucalyptus camaldulensis* (QUEIROZ et al., 2008; WERTHER, 2011) e associado a novas espécies vegetais que foram sugeridas como possíveis nichos ecológicos do fungo, sendo encontrado em ocos de diferentes árvores nativas de continentes tropicais e subtropicais como *Cassia grandis*, *Senna multijuga*, *Ficus microcarpa*, *Acacia visca*, *Cedrus deodara*, *Ceasalpineia peltophoroides*

(LÁZERA et al., 2000; REIMÃO et al., 2007; REFOJO et al., 2008; MAZZA et al., 2013).

Sabe-se que as excretas de aves funcionam como uma fonte nutritiva para *Cryptococcus*. Entretanto, estudos demonstraram que *C. gattii* é raramente observado em fezes de aves, mesmo utilizando melhor a creatinina como fonte de nitrogênio, como a var. *grubi* e *neoformans* (ABEGG et al., 2006).

A infecção pode ocorrer pela inalação de propágulos de origem ambiental (LEVITZ, 1991) representados por leveduras desidratadas, menores que 2 µm de diâmetro, facilmente aerossolizadas (FILIÚ et al., 2002), a partir de locais contaminados por fezes secas, pela ingestão de poeira e/ou alimentos contaminados com as excretas de aves, sendo eventualmente eliminadas para o meio ambiente. Pela ação do ar, os propágulos contaminariam outras excretas de pombos não contaminadas (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

O isolamento de *Cryptococcus* spp. a partir de excretas de psitacídeos (FILIÚ et al., 2002), passeriformes (LUGARINI et al., 2008; MARINHO et al., 2010), morcegos (TENCATE et al., 2012), columbiformes (CICHON et al., 2011) e falconiformes (CAFARCHIA et al., 2006) tem sido relatado constantemente na literatura e muitas vezes associado ao hábito da ave de raspar e fragmentar pedaços de madeira e galhos (FILIÚ et al., 2002).

O isolamento do fungos a partir de amostras ambientais vem sendo amplamente pesquisado como demonstraram López-Martinez et. al. (1995) , Lázera et al. (2000), Kobayashi et al. (2005), Refojo et al. (2008), Mazza et al. (2013), que determinaram novas fontes de transmissão, identificando outros nichos ecológico para a levedura.

A presença de *Cryptococcus neoformans* no solo e em dejetos secos de pombos têm sido motivo de estudo em vários países do mundo (FILIÚ et al., 2002). Alguns trabalhos o associam ao pombo, criando uma constante

associação entre fungo-hospedeiro (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984; FERREIRA; RASO, 2012). Entretanto Passoni (1999), afirma que o habitat primário para o *Cryptococcus gattii* possa ser espécies de plantas e madeira envelhecida; locais onde a levedura naturalmente desenvolva o estado sexuado e caracteriza um novo *habitat* natural, relacionando-o a madeira em decomposição de diferentes árvores tropicais nativas ou exóticas, introduzidas no Brasil (BRASIL, 2012), corroborando a permanência do *Cryptococcus* no ambiente. Este fato é favorecido, tanto pelo *C. gattii* e *C. neoformans* pela capacidade de produzir lacase (fenol oxidase), que permite a colonização da madeira, principalmente em estado avançado de decomposição (BALTAZAR; RIBEIRO et al, 2008).

O presente trabalho visou investigar novos *habitats* para *Cryptococcus* sp. a partir de amostras ambientais do Município de Araçatuba, São Paulo, com objetivo de compreender melhor a ecoepidemiologia do micro-organismo e conhecer novos nichos ambientais do patógeno para que posteriormente, medidas preventivas possam ser elaboradas afim de minimizar os riscos de contaminação humana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Determinação da área de coletas

Araçatuba é um município localizado na região noroeste do estado de São Paulo, localizada a uma latitude 21° 12'32" sul e a uma longitude 50° 25'28" oeste, estando a uma altitude de 390m, clima tropical semi úmido, com temperatura média anual de 28°C, temperatura média máxima de 32°C e média mínima de 27°C (PREFEITURA MUNICIPAL DE ARAÇATUBA, 2014).

Para definição dos locais de colheitas utilizamos o mapa geográfico da cidade de Araçatuba, São Paulo, ilustrado na Figura 1, o qual apresenta os locais marcados em verde correspondente às colheitas.

Considerando o perímetro urbano de Araçatuba, foram selecionados 10 locais não protegidos (praças e parques), próximos às ruas movimentadas ou a um fluxo significativo de pessoas e animais.

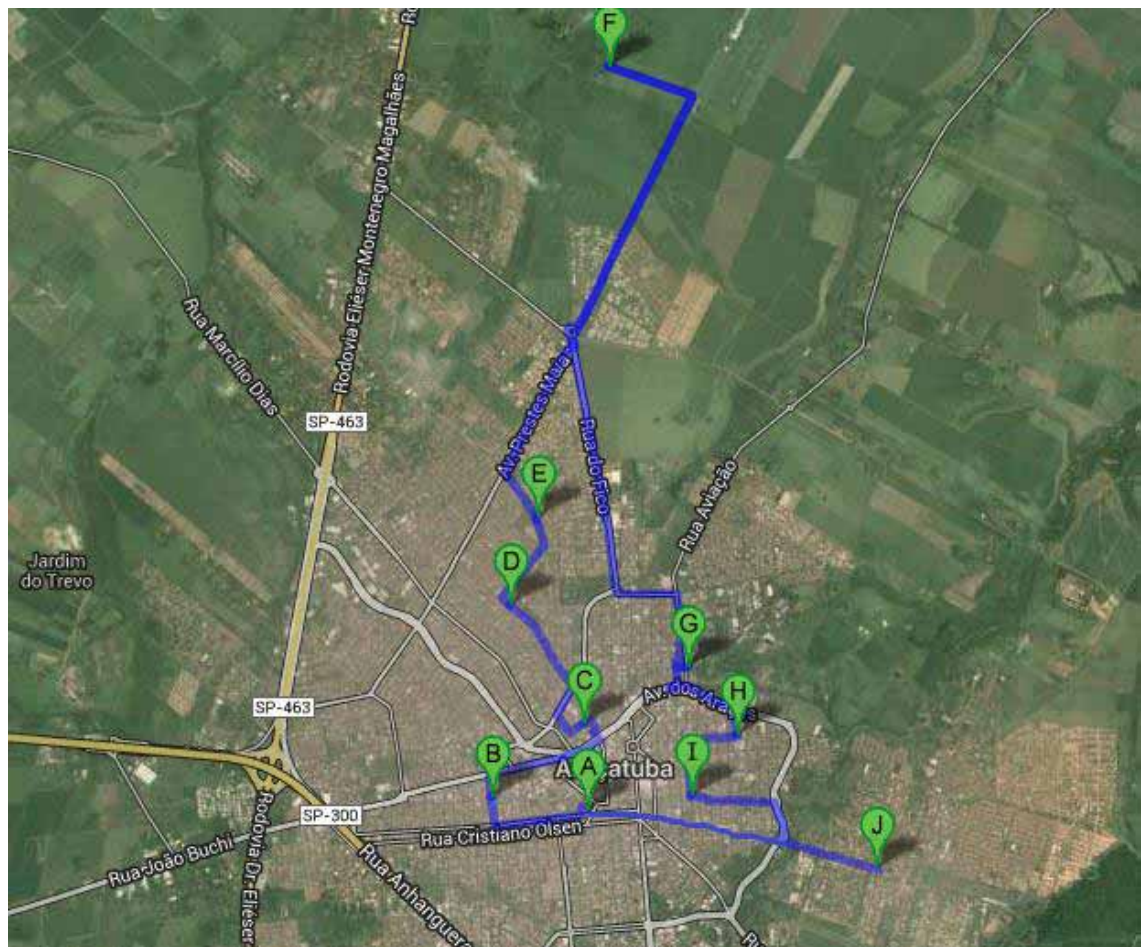


Figura 1. A- Praça Getúlio Vargas, B - Praça São João, C – Praça São Joaquim, D – Praça Paraíso, E – Lagoa do Miguelão, F – Aeroporto, G – Praça Diogo Junior, H – Praça Doutor Jaime de Oliveira, I – Praça Ettore Protti, J – Country Club de Campo. Fonte: Google Earth

2.2 Amostras

Para verificar a ocorrência de *Cryptococcus* spp., foram colhidas no período de agosto à dezembro de 2013, 50 amostras ambientais. As amostras foram provenientes de fragmentos de troncos e material putrefado de ocos de árvores (*Sibipiruna*, *Ficus* e *Cassia*), sem a presença de fezes de aves, por meio de raspagem com curetas individuais esterilizadas. As amostras foram armazenadas em frascos plásticos estéreis, com tampa de rosca, e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia e Micologia da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP-Araçatuba.

2.3 Cultivo microbiano

As amostras ambientais foram processadas em câmaras de fluxo laminar, onde 1g do material coletado foi macerado utilizando-se pistilo e gral, e foi colocado em um frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de solução salina estéril a 0,9%, a qual foi adicionada cloranfenicol (100 µg/mL). Após vedação do frasco com parafilm®, as amostras foram para o vórtex por 5 minutos e posteriormente deixadas em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, sendo então transferidos 10mL do sobrenadante para tubos e centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. Foram descartados 9 mL do sobrenadante, e o sedimento homogeneizado no volume restante, de onde foi para a semeadura em placas de Petri com meio de ágar semente de Níger e Sabouraud dextrose com cloranfenicol, sendo incubadas a 30°C durante 5 (cinco) dias.

2.4 Isolamento e identificação

As colônias com crescimento sugestivo para levedura foram repicadas em placas contendo ágar Níger, até a obtenção de colônias puras. As colônias sugestivas de *Cryptococcus* spp., com coloração marrom-escura, foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose a 4% para identificação e manutenção da amostra. Todas as colônias leveduriforme foram submetidas à coloração com tinta nanquim e lactofenol-azul-algodão, para a análise morfológica das estruturas fúngicas. As colônias identificadas para o gênero *Cryptococcus* foram submetidas à testes bioquímicos.

2.5 Hidrólise da uréia

As colônias com crescimento macro e micromorfológico característico para *Cryptococcus* spp foram semeadas em tubos contendo uréia-ágar-base (CHRISTENSEN, 1946), incubadas a 25° C e observadas diariamente por um período de 5 dias .

2.6 Termotolerância a 37°C

As colônias com crescimento macro e micromorfológico característico para *Cryptococcus* spp foram semeadas em tubos contendo ágar Sabouraud e incubadas a 37°C (SIDRIM; MOREIRA, 1999) por um período de 7 dias. As espécies patogênicas, *C. neoformans* e *C. gattii* apresentavam crescimento puro e exuberante quando expostas a temperatura supracitada.

2.7 Quimiotipagem

Para diferenciar as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* foi utilizado o teste de CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol), (Know-Chung et al., 1982), conforme Figura. Os isolados foram repicados em meio CGB e incubados a 30°C por até cinco dias, onde observou-se diariamente a coloração do meio. Foram utilizadas duas amostras de referência, um isolado ATCC de *C. neoformans* e outro de *C. gatti*, obtidas junto ao Laboratório de Micologia da FIOCRUZ/RJ.

2.8 Análise Estatística

As variáveis foram testadas pelo Teste Exato de Fisher e o Teste Qui-Quadrado, sendo adotado o nível de significância de 5%. Utilizou-se o programa SAS (2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram associadas as variáveis árvores e espécies de micro-organismo ($p \leq 0,8855$); local e espécie de micro-organismo ($p \leq 0,2904$), por meio do teste exato de Fisher. Para a análise de tendências utilizou-se o teste Qui-Quadrado das variáveis tempo e espécie de micro-organismo ($p \leq 0,7466$). As associações não foram significativas, ou seja, o *Cryptococcus* pode ser encontrado em diferentes locais, espécies de árvores e período do ano.

No meio de cultura ágar Níger descrito por Staib (STAIB, 1962a; STAIB, 1962b), modificado por Shields e Ajello (SHIELDS; AJELLO, 1966), as colônias de *C. neoformans* e *C. neoformans gattii* adquirem uma coloração marrom, devido à atividade fenol oxidase em presença de substrato contendo compostos fenólicos. Os isolados característicos de *Cryptococcus* apresentaram em meio de cultura contendo ágar semente de Níger, colônias de coloração marrom-escuro, sendo repicadas em novas placas contendo ágar Níger para obtenção de colônias puras e exuberantes (Figura 2). Na análise microscópica, foram observadas estruturas redondas e ovais com a presença de cápsula, utilizando o corante lactofenol azul-de-algodão (Figura 3A), e por meio da tintura da China, conhecida como Nanquim, observou-se a presença de cápsulas mucopolissacarídicas (Figura 3B).



Figura 2. Colônias puras e exuberantes em ágar sementes de Níger. Fonte: Laboratório de Bacteriologia e Micologia - FMVA - Unesp, 2013.

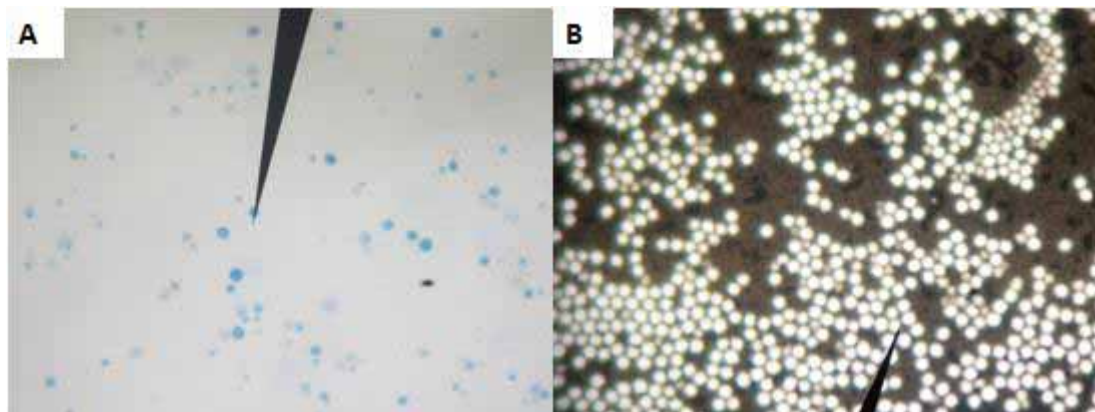


Figura 3. Análise das estruturas morfológicas de colônias sugestivas de *Cryptococcus* spp. **A)** Estruturas arredondas e ovais coradas com Lactofenol azul-de-algodão. **B)** Nanquim positivo: cápsulas mucopolissacarídicas não pigmentadas. Fonte: Laboratório de Bacteriologia e Micologia - FMVA - Unesp, 2013.

As amostras sugestivas de *Cryptococcus* spp. foram submetidas aos testes bioquímicos. O primeiro, foi o teste da urease, onde colônias puras foram repicadas em meio uréia-ágar-base e incubados a 30°C por cinco dias. Nesta reação, observou-se a hidrólise da uréia com produção de amônia e alcalinização do meio, causando alteração do indicador de pH de neutro para básico, evidenciando-se, assim, uma coloração de tom róseo intenso, classificada como urease positiva, ou seja, representa a presença de

Cryptococcus spp. Todas as amostras foram classificadas como urease positiva (Figura 4).



Figura 4. Teste da Urease. Fonte: Laboratório de Bacteriologia e Micologia - FMVA - Unesp, 2013.

Dezessete (17) amostras foram urease positivas, sendo submetidas ao segundo teste bioquímico, a termotolerância a 37°C, e repicadas em ágar Sabouraud com cloranfenicol, incubadas a 37°C por sete dias e 100% das amostras foram positivas, tolerando à 37°C (Figura 5). Somente *C. neoformans* e *C. gattii* possuem esta habilidade, estando diretamente relacionada ao potencial de disseminação do isolado fúngico no organismo do hospedeiro (PETIT et al., 2010).



Figura 5. Crescimento de leveduras de *Cryptococcus* spp. à 37°C. Fonte: Laboratório de Bacteriologia e Micologia - FMVA - Unesp, 2013.

Para diferenciar as espécies de *Cryptococcus*, realizou-se a quimiotipagem por meio do teste em meio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol) como proposto por Kwon-Chung et al. (1982). As colônias de *C. gattii* utilizam a glicina como fonte de carbono e nitrogênio e são resistentes à canavanina, crescendo neste meio, promovendo alteração do pH e evidenciando uma coloração azul-cobalto, enquanto que *C. neoformans*, por ser sensível à presença da canavanina, não se desenvolve, não ocasionando alteração de pH com consequente mudança na coloração do meio.



Figura 6. Teste em meio CGB (canavanina glicina azul-de-bromotimol). Fonte: Laboratório de Bacteriologia e Micologia - FMVA - Unesp, 2013.

Das 50 amostras colhidas de troncos e ocos de árvores, 17 (34%) dos cultivos foram positivos para o *Cryptococcus*, sendo que 9 (18%) foram de *Cryptococcus gattii* e 8 (16%) para *Cryptococcus neoformans*, respectivamente. Outras leveduras correlacionadas como *Rhodotorula* sp. e *Candida* sp. também foram isoladas.

As amostras colhidas em 6 locais de colheita (60%) apresentaram crescimento puro e exuberante para uma única espécie de *Cryptococcus*, enquanto que outros três locais (30%) houve crescimento associado das espécies de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. Em apenas um local específico (Praça Dr. Jaime de Oliveira), a amostra resultou no cultivo negativo para o micro-organismo estudado (Fig. 7). A maioria das amostras com cultivos associados para ambas as espécies foram provenientes de *Caesalpineia peltophoroides* (Sibipiruna), enquanto que os cultivos isolados foram oriundos de *Ficus* sp. e *Cássia* sp. Ressalta-se que em todos os locais havia grande fluxo de pessoas e animais, inclusive do local onde não houve crescimento microbiológico.

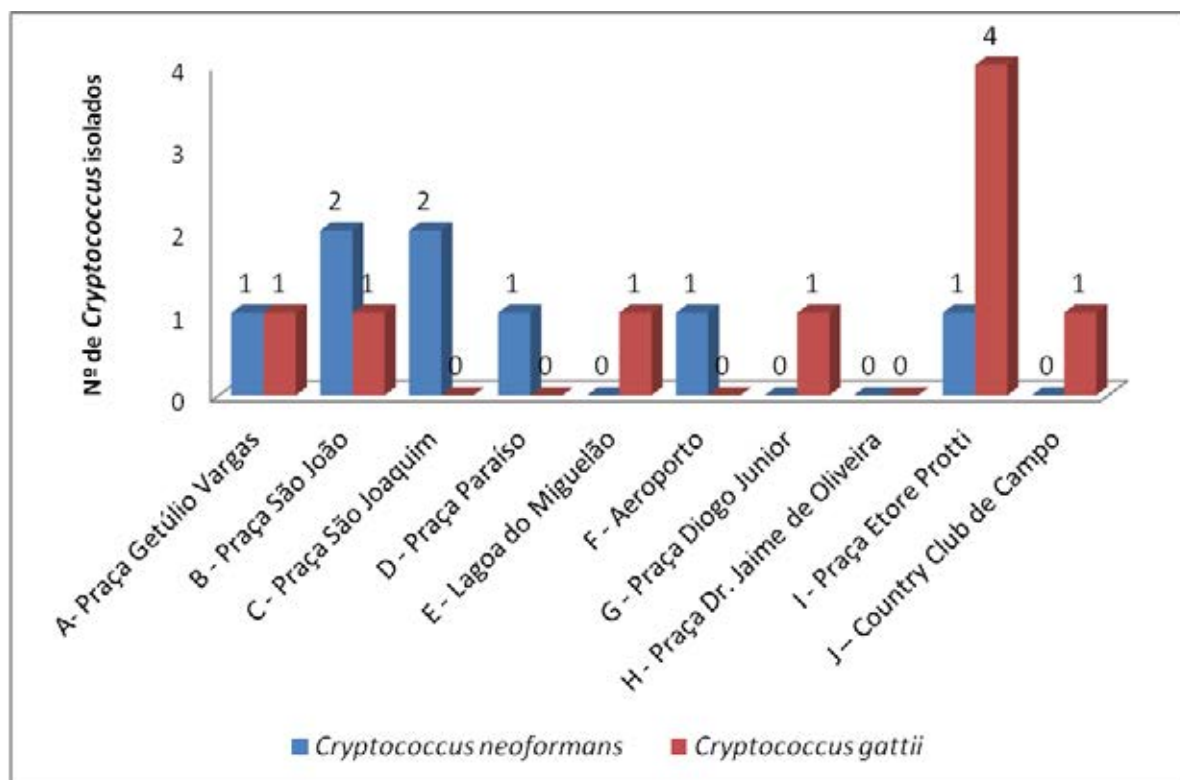


Figura 7. Leveduras do gênero *Cryptococcus* sp isoladas de pontos estratégicos da cidade de Araçatuba, São Paulo, 2013.

Segundo Kwon-Chung e Rhodes (1986), a melanina é um fator de virulência para leveduras de *C. neoformans* e *C. gattii*, associada ao mecanismo de evasão do sistema imunológico do hospedeiro, dificultando a fagocitose das leveduras. No presente estudo, quinze amostras foram capazes de produzir melanina por meio da atividade de fenol oxidase em 48 horas após incubação no meio contendo ágar semente de Níger. Os outros dois isolados, apresentaram coloração bege no mesmo meio de cultura, não apresentando a atividade de fenol oxidase.

Nossos resultados diferem de Cichon et al. (2011) e Yamamura et al. (2013), nos quais a análise de cultivos de madeira em decomposição, não resultou em isolamento de *Cryptococcus* spp. No entanto, assemelham-se aos observados por Lázera et al. (2000) cuja análise de 32 amostras obtidas de ocos de árvores, verificaram o isolamento de 123 colônias de *C. neoformans* e

Cryptococcus gattii, como também aos resultados de Costa et al. (2009) que obtiveram isolamento ambiental de ambas as espécies em oco de *Senna siamea* na cidade de Belém. Filiú et al. (2002), Baltazar e Ribeiro (2008), Mazza et al. (2013), isolaram a variedade *C. gattii* e *C. neoformans* de diferentes espécies de árvores demonstrando que além dos eucaliptos australianos, árvores nativas e exóticas podem ser consideradas reservatórios de *Cryptococcus gattii*.

Os resultados dessa pesquisa confirmam o isolamento de *Cryptococcus gatti* e *C. neoformans* de tronco de *Cassia* sp; tronco e oco de *Ficus* sp. e tronco de *Caesalpineia peltophorides*.

De acordo com Beheregaray et al. (2005), temperaturas superiores a 30°C, diminuiria a viabilidade da levedura no ambiente. Entretanto as coletas foram realizadas entre agosto à dezembro, quando a temperatura média oscilou entre 30.8° a 32°C, com sensação térmica de 33 à 35°C (PREFEITURA MUNICIPAL DE ARAÇATUBA, 2014) e mesmo assim foi obtido crescimento puro e exuberante em primo isolamento. No entanto há de se considerar que durante as colheitas entre o período de agosto à meados de outubro, onde a cidade de Araçatuba, São Paulo, passou por momentos de baixa umidade com escassez de chuva, as colônias leveduriformes com características de *Cryptococcus* sp., durante a análise microscópica, apresentaram-se muito pequenas, dificultando a observação das estrutura morfológica, como a presença de cápsulas e brotamento. Já no período de maior umidade, entre novembro à dezembro, as colônias sugestivas de *Cryptococcus* sp. durante a análise microscópica, estavam com suas estruturas nítidas, de fácil observação. Fica notório que o micro-organismo pode se adaptar à diferentes temperaturas, seja até 37°C ou abaixo de 10°C como ocorre na Ilha de Vancouver no Canadá, área de clima frio e temperado (FRANZOT et al., 1999; GALANIS et al., 2010). O que pode corroborar para a inviabilidade da levedura no ambiente é a baixa umidade.

Com relação ao binômio fungo – hospedeiro, o *C. gatti* não tem sido isolado de pombos, e como afirma Pfeiffer e Ellis (1993) e Passoni (1999) o habitat primário para o micro-organismo pode ser espécies de plantas e madeiras envelhecidas, dissociando assim, a figura do pombo como hospedeiro.

O problema que agrava a existência de microfocos ambientais para o *C. gattii* fundamenta-se na virulência do patógeno que, geralmente, atua como agente primário para a Criptococose, independente do estado imunológico. De acordo com Correa et al. (1999), a infecção por *C. gattii* pode ainda permanecer quiescente por um longo período, infectando-se em uma fase precoce da vida (infância) para exteriorizar os sintomas em uma fase tardia.

Segundo Swinne (1979) e Idnurm et al. (2005) o *C. neoformans* encontra-se vinculado ao pombo, apresentando uma complexa interação entre o fungo, o ambiente e o hospedeiro, entretanto há de se considerar a eventualidade com que o *C. neoformans* é eliminado com as excretas após o término do ciclo gastrointestinal. Sendo assim, destaca-se a sua permanência e viabilidade no ambiente como a sua disseminação pela ação do vento, carreando os propágulos para outras excretas, adjacentes, e presentes no solo (CASADEVALL; PERFECT, 1998), como sendo fatores relevantes à formação de microfocos e a ampliação dos riscos de contaminação ambiental.

A presença de fungos correlacionados, como *Candida* sp. e *Rhodotorula* sp. também foram observados em excretas de psitacídeos (LUGARINI et al., 2007), passeriformes (MARINHO et al., 2010), fezes de morcegos (TENCATE et al., 2012), corroborando o fato do problema que envolve a permanência de excretas no ambiente, constituindo-se em uma fonte nutritiva para as leveduras e ampliando-se os riscos de contaminação.

4 CONCLUSÃO

Pelo exposto, conclui-se que:

- 1) Espécies vegetais presentes nas praças e parques da cidade de Araçatuba, constituem-se em microfocos para *Cryptococcus* spp.
- 2) As espécies isoladas de troncos e ocos de árvores foram o *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.
- 3) Em relação ao *C. neoformans*, também observou-se dissociação no binômio hospedeiro-fungo na cidade de Araçatuba, uma vez que, o mesmo foi isolado de tronco e ocos de árvores.

5 REFERÊNCIAS

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

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.

BEHEREGARAY, W. K.; PÖPPL, A. G.; HARTFELDER, C. C.; LANDELL, M.; VALENTE, P.; OLIVEIRA, I. A.; FERREIRO, L.; OLIVEIRA, R. T.; MACHADO, M. L. S.; PIGATTO, J. A. T.; FERREIRA, R. R.; MELLO, F. P. S. Criptococose em um cão com envolvimento de linfonodos, pele, olhos e glândula mandibular. **Revista Universidade Rural**, 25(Suplemento), p. 252-253, 2005.

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

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; IATTA, R.; CAMARDA, A.; MONTAGNA, M. T.; OTRANTO, D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. **Medical Mycology**, v.44, p. 485-492, 2006.

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

CICHON, M.; VICENTE, V. A.; MURO, M. D.; BORDIGNON, G. P. F.; QUEIROZ-TELLES, F. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de amostras

ambientais de Curitiba e região metropolitana (Paraná, Brasil) e testes de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, p.176-179, 2011.

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.

CORREA, M. P.; OLIVEIRA, E. C.; DUARTE, R. R.; PARDAL, P. P.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Cryptococcosis in children in the State of Para, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 505-508, 1999.

FERREIRA, V. L.; RASO, T. F. Survey of cryptococcal antingens in urban pigeons (*Columbia livia*) in São Paulo State, Brazil. **Journal of Poultry Science**, v. 11, p. 1-4, 2012.

FILIÚ, W. F. O.; WANKE, B.; AGÜENA, S. M.; VILELA, V. O.; MACEDO, R. C. L.; LAZÉRA, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 591-595, 2002.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CAADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of clinical Microbiology**, v. 37, p. 838-840, 1999.

GALANIS, E.; MACDOUGALL, L.; KIDD, S.; MORSHED, M. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999 - 2007. **Emerging Infectious Disease**, v. 16, p. 251-257, 2010.

IDNURM, A.; BAHN, Y. S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J. A.; HETMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews - Microbiology**, v.3, 2005.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; BRITO, S. L. A.; SILVA, A. C.; SOUSA, E. D.; SILVA, M. R. R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 7, p. 203-207, 2005.

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

KWON-CHUNG, K. J.; BENNET, J. E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Epidemiology**, v.120, p. 123-130, 1984.

KWON-CHUNG, K. J.; RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 51, p. 218-223, 1986.

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.

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.

LEVITZ, S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 1163-1169, 1991.

LÓPEZ-MARTINEZ, R.; CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from bird droppings fruits and vegetable in Mexico city. **Micopathologia**, v. 129, p.25-28, 1995.

LUGARINI, C.; CONDAS, L. A. S.; SORESINI, G. C.; SANTOS, R. C. F.; MURO, M. D.; FARIAS, M. R.; MONTIANI-FERREIRA, F. Screening of antigenemia and isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from cloaca and crop of birds in the state of Paraná, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 341-344, 2008.

MARINHO, M. TAPARO, C. V.; SILVA, B. G.; TENCATE, L. N.; PERRI, S. H. V. Microbiota fúngica de passeriformes de cativeiros da região noroeste do Estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 2, p.288-292, 2010.

MAZZA, M.; REFOJO, N.; BOSCO-BORGEAT, M. E.; TAVERNA, C. G.; TROVERO, A. C.; ROGÉ, A.; DAVEL, G. *Cryptococcus gattii* in urban from cities in North-eastern Argentina. **Micoses**, v. 56, p. 646-650, 2013.

PASSONI, L. F. C. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v. 16, p. 77-81, 1999.

PETIT, R. K.; REPP, K. K.; HAZEN, K. C. Temperature affects the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents. **Medical Mycology**, v. 48, p. 421-426, 2010.

PFEIFER, T.; ELLIS, D. Ecology of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON *CRYPTOCOCCUS* & *CRYPTOCOCCOSIS*. v. 42, 1993. **Milano**.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE ARAÇATUBA. Portal da prefeitura do município de Araçatuba. Disponível em: <http://www.aracatuba.sp.gov.br/> Acesso em: 08 jan. 2014.

QUEIROZ, J. P. A. F.; SOUSA, F. D. N.; LAGE, R. A.; IZAEL, M. A.; SANTOS, A. G. Criptococcose – uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinária Brasileira**, v.2, p. 32-8, 2008.

REFOJO, N.; PERROTA, M. ; BRUDNY, R. ; ABRANTES, A.; HEVIA, I.; DAVEL, G. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. **Medical Mycology**, p. 1-8, 2008.

RIBAS, R. C.; BAEZA, L. C.; RIBEIRO, F. H. M.. Isolation of *Cryptococcus* spp. in excrements of pigeons (*Columba* sp.) in the Maringa city, PR, Brazil. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 15, p.45-50, 2

SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.3. SAS Institute Inc., Cary: NC, 2013.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Diagnóstico laboratorial das leveduras. In: SIDRIM J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.76-89.

SILVA, J. O., CAPUANO, D. M. Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, nos excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 67, p. 137-141, 2008.

SHIELDS, A.; AJELLO, L. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. **Science**, v. 151, p. 208-209, 1966.

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (syn.*G.oleífera*) Farbreaktion fur (*Cryptococcus neoformans*). **Zentralbl Bakteriologie**, v. 148, p. 466-475, 1962a.

STAIB, F. Vogelkot, ein Nahsubstrat fur die Gattung *Cryptococcus neoformans*. **Mykosen**, v. 11, p. 267-272, 1962b.

SWINNE, D. *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of criptococcosis. **Annales de la Societe de Medicine Tropicale**, v. 59, p. 285-299, 1979.

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 gastrintestinal 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.

WERTHER, K.; SOUSA, E.; ALVES-JUNIOR, J. R. F.; ARDISSON, F. A.; GIANNINI, M. J. S. M. *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus albidus* in Captive Domestic Pigeon (*Columba livia*). **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, São Paulo, v. 4, p.247-249, 2011.

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

