

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

**ISOLAMENTO DE *Cryptococcus* spp. em AMOSTRAS
AMBIENTAIS DE PENÁPOLIS, SP**

Telma Fernanda Mendonça
Enfermeira

ARAÇATUBA – SP
2018

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

**ISOLAMENTO DE *Cryptococcus* spp. em AMOSTRAS
AMBIENTAIS DE PENÁPOLIS, SP**

Telma Fernanda Mendonça
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Marinho
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Luzia Helena Queiroz

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – Unesp, Campus
de Araçatuba, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal.

ARAÇATUBA – SP
2018

M539i	Mendonça, Telma Fernanda Isolamento de <i>Cryptococcus</i> spp. em amostras ambientais de Penápolis, SP / Telma Fernanda Mendonça. -- Araçatuba, 2018 44 p. : fotos, mapas + 1 CD-ROM Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba Orientadora: Márcia Marinho Coorientadora: Luzia Helena Queiroz 1. Árvores em decomposição. 2. <i>Cryptococcus</i>. 3. Fungos. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

ISOLAMENTO DE *Cryptococcus* spp. EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE PENÁPOLIS,

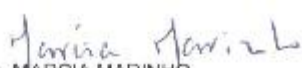
SP

AUTORA: TELMA FERNANDA MENDONÇA

ORIENTADORA: MARCIA MARINHO

COORIENTADORA: LUZIA HELENA QUEIROZ

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


Prof. Dra. MARCIA MARINHO

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


Prof. Dr. SERGIO DINIZ GARCIA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dra. FERNANDA BOVINO

Curso de Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina/FEA

Araçatuba, 06 de novembro de 2018.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TELMA FERNANDA MENDONÇA - nascida em 03 de abril de 1982, na cidade de Penápolis/SP, graduada em enfermagem no ano de 2011, pela Faculdade de Saúde São Paulo. Realizou especialização em Administração Hospitalar na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. No ano de 2016 ingressou no programa de pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) - UNESP, como aluna regular do programa de mestrado.

**Aos meus pais que sempre me
incentivaram, mesmo diante das
dificuldades.**

**Ao meu namorado que esteve ao
meu lado em todos os momentos.**

A minha irmã pelo carinho.

**A minha amiga Renata Vidal que
sempre me apoiou.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela saúde recuperada.

Aos meus pais Paulo e Idalina, que estiveram sempre presentes nos bons e maus momentos, me apoiando e me incentivando a continuar.

Ao meu namorado Fábio, presente durante todo esse processo, com seu apoio e carinho.

Agradeço a minha irmã Ana Paula, que esteve torcendo por mim.

À Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP – Campus Araçatuba.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP - Campus de Araçatuba

À professora Márcia Marinho, obrigada pelas palavras e oportunidade, através de sua competência e disposição a me orientar, estou realizando esse projeto de vida.

Pela atenção e gentileza, sempre dispensada pela professora Luzia Helena Queiroz. A equipe do laboratório de microbiologia, Cilene, Erivelto, Dielson, Laura, Andrey e Idemar, que me acolheram e me fizeram parte dessa família.

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana. ”

Louis Pasteur

MENDONÇA, T. F. **Isolamento de *Cryptococcus* spp. em amostras ambientais de Penápolis, SP.** 2018. 44 f. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2018.

RESUMO

As espécies de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os agentes etiológicos da criptococose, que se caracteriza por ser uma infecção sistêmica de caráter crônico e com potencial zoonótico. São micro-organismos oportunistas, encontrados em substratos de origem animal e vegetal amplamente distribuídos. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença de microfocos de *C. neoformans* e *C. gattii*, a partir de amostras ambientais da cidade de Penápolis – SP. Foram coletadas 100 amostras provenientes de praças e locais públicos, escolhidos de forma aleatória, de cobertura abrangente à área da cidade. Após a coleta as amostras foram devidamente acondicionadas e encaminhadas ao laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária (Unesp/FMVA), onde foram processadas e semeadas em meios de ágar semente de Níger e *Sabouraud* dextrose acrescido de cloranfenicol e incubadas a 30°C em estufa microbiológica por um período não inferior a cinco dias e monitoradas diariamente. As colônias que apresentaram crescimento macromorfológico sugestivo para *Cryptococcus* spp. foram coradas com tinta nanquim e lactofenol azul de algodão para análise micromorfológica e posteriormente submetidas aos testes bioquímicos: Hidrólise da ureia, Termotolerância e Ágar CGB (L-canavanina-glicina-azul de bromotimol). Os resultados demonstraram a presença de 14% (14/100) de *C. gattii* sendo negativo para cultivo e isolamento de *C. neoformans*. As amostras que apresentaram crescimento positivo foram provenientes das espécies *Ficus benjamina*, *Syzygium cumini*, *Caesalpinia pluviosa*, *Licania tomentosa*, *Bauhinia forficata*, *Pachira aquática*, *Artocarpus heterophyllus*, *Lagerstroemia speciosa* e *Samanea tubulosa*. O local de maior isolamento para o fungo ocorreu em amostras oriundas da estrada municipal Boa Esperança com incidência de 28,57% (4/14). Conclui-se que o *C. gattii* encontra-se presente em amostras ambientais constituindo-se em microfocos, provenientes de árvores de locais Públicos da cidade de Penápolis.

Palavras-chave: Árvores em decomposição. *Cryptococcus*. Fungos.

ABSTRACT

ISOLATION OF *Cryptococcus* spp. in ENVIRONMENTAL SAMPLES OF PENÁPOLIS, SP

The species of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* are the etiological agents of cryptococcosis, which is characterized as a chronic systemic infection with zoonotic potential. They are opportunistic microorganisms, found in widely distributed substrates of animal and vegetal origin. The objective of this work was to identify the presence of microfocus of *C. neoformans* and *C. gattii*, from environmental samples in the city of Penápolis - SP. We collected 100 samples from public squares and public places, randomly chosen to cover the city area. After collection, the samples were duly conditioned and sent to the microbiology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine (Unesp / FMVA), where they were processed and seeded in media of Niger seed agar and Sabouraud dextrose agar plus, chloramphenicol and incubated at 30°C in a microbiological oven for a period of not less than 5 days and monitored daily. The colonies that presented macromorphological growth suggestive of *Cryptococcus* spp. were stained with nanquim ink and blue cotton lactophenol for micromorphological analysis and subsequently submitted to biochemical tests: Urea hydrolysis, Thermotolerance and Agar CGB (L-canavanine-glycine-bromothymol blue). The results demonstrated the presence of 14% (14/100) of *C. gattii* being negative for cultivation and isolation of *C. neoformans*. The samples that showed positive growth were from the species *Ficus benjamina*, *Syzygium cumini*, *Caesalpinia pluviosa*, *Licania tomentosa*, *Bauhinia forficata*, *Pachira aquatica*, *Artocarpus heterophyllus*, *Lagerstroemia speciosa* and *Samanea tubulosa*. The site of greatest isolation for the fungus occurred in samples from the Boa Esperança municipal road with incidence of 28.57% (4/14). It was concluded that *C. gattii* is present in environmental samples constituting in microfocus, coming from trees of public places of the city of Penápolis.

Keywords: *Cryptococcus*. Decomposing trees. *Fungi*

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CGB	L-canavanina-glicina-azul de bromotimol
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LCR	Líquido cefalorraquidiano
SNC	Sistema nervoso central
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Histórico	16
2.2 Agente etiológico	17
2.3 Epidemiologia	18
2.4 Patogenia	20
2.5 Aspectos clínicos	21
2.6 Tratamento	22
3 OBJETIVOS	24
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO DE <i>Cryptococcus</i> spp. em AMOSTRAS AMBIENTAIS DE PENÁPOLIS, SP	29
Resumo	29
ABSTRACT	30
1 INTRODUÇÃO	31
2 METODOLOGIA	33
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Cryptococcus spp. são leveduras capsuladas que se disseminam amplamente e são mundialmente reconhecidas como importantes patógenos fúngicos oportunistas. Embora o gênero *Cryptococcus* se constitua de mais de 70 espécies, somente duas são causadoras de manifestações clínicas mais graves de criptococose: *C. neoformans* e *C. gattii* (GOMES et al., 2010).

Cryptococcus neoformans e *C. gattii* correspondem à forma assexuada de basidiomicetos zoopatógenos. Apresentam-se como leveduras globosas ou ovaladas, com 3 a 8 µm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplos de colo estreito, e envolvidas por cápsula mucopolissacarídica característica, colônia de cor branca a creme, 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% (MORETTI et al., 2008).

Infecção por esses agentes é denominada Criptococose, e é uma micose sistêmica mundialmente difundida, aos quais o homem, os animais domésticos e silvestres estão amplamente expostos (ROCHA; SIDRIM, 2004).

Dentre as micoses sistêmicas, a criptococose tem sido relatada como a mais prevalente em termos de internação. Dados do Sistema de Internação Hospitalar do Sistema Único de Saúde (SUS) demonstram que a criptococose apresentou o maior número de internações no período de 2000 a 2007 (BRASIL, 2012).

Montenegro e Paula (2000) registraram fontes ambientais de *Cryptococcus* spp em árvores na cidade de São Paulo. Semelhante a Brasil (2012), que caracterizou um novo habitat natural para o microorganismo, relacionando-o a madeira em decomposição, ou não, em diferentes árvores tropicais nativas ou introduzidas no Brasil.

Cryptococcus spp são encontrados em diversos substratos orgânicos, *habitat* de aves e excretas secas, ricas em fontes de nitrogênio, como ureia e creatinina. Em

condições favoráveis ao crescimento abundante desta levedura formam-se microfocos, notadamente em centros urbanos (MORETTI et al., 2008).

Fontes ambientais de *Cryptococcus* foram progressivamente identificadas em árvores de diferentes partes do Brasil: Rio de Janeiro (RJ), em Teresina (PI), em Boa Vista e Ilha de Maracá (RR), no interior do Amazonas e na Cidade de São Paulo. Nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil essas fontes são associadas à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome) (BRASIL, 2012).

O ambiente domiciliar, particularmente na poeira doméstica, pode apresentar positividade de *cryptococcus* spp.; também foram encontrados focos positivos em habitat de diferentes espécies de aves, sobretudo aves gregárias em cativeiro (MORETTI et al., 2008).

A criptococose é considerada esporádica, associada à deficiência na imunidade celular. Ocorre num pequeno percentual da população, mas aumentou a partir dos anos 80, com a pandemia da AIDS e a utilização de medicamentos imunossupressores, sendo atualmente a infecção fúngica de maior prevalência mundial (ROZENBAUM; GONÇALVES, 1994; PAPPALARDO; MELHEM, 2003).

A doença, causada por *C. gattii*, ocorre na América Latina, no Peru, Colômbia, Argentina, Venezuela, Brasil, Austrália, Nova Guiné, países da África Central, sudeste da Ásia, México e algumas regiões dos Estados Unidos. No Brasil, estudos clínico-epidemiológicos mostram a importância da criptococose por *C. gattii* no sistema nervoso central em adultos jovens de ambos os sexos e crianças nas regiões norte e nordeste, atingindo uma letalidade de 35% a 40%. No Brasil, apresenta um caráter oportunista, como primeira manifestação em cerca de 4,4% dos casos de AIDS, sob forma de surtos (BRASIL, 2012).

Diversos fatores têm sido associados à criptococose em animais, dentre eles encontram-se: debilidade, desnutrição, uso prolongado de corticosteróides e infecções virais como aquelas causadas pelo vírus da imunodeficiência e da leucemia felinas (KOMMERS et al., 2005). Nos animais não há resposta inflamatória celular marcada típica, geralmente são observados poucos macrófagos, linfócitos e plasmócitos (RYAN; WYAND, 1981). As granulomas nos pulmões são mais típicas, contendo células epitelióides e células gigantes multinucleadas (KOMMERS et al., 2005).

Observa-se um aumento da criptococose afetando tanto o homem como os animais, sendo considerada atualmente a doença com maior morbidade e mortalidade entre os pacientes soropositivos (QUEIROZ et al., 2008). Portanto é de extrema importância a descoberta de focos ambientais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A primeira descrição de criptococose humana foi feita em 1894 por Busse (patologista) e Buschke (clínico), que observaram a forma arredondada da levedura em tecido ósseo e isolaram o agente em cultivo, denominando-o *Saccharomyces hominnis*. (BRASIL, 2012).

No mesmo ano houve registros isolados desses agentes por Sanfelice na Itália, que descreveu uma levedura encapsulada isolada de suco de pêssogo e identificada como patogênica para animais experimentais em 1895. A partir de 1900 surgiram inúmeros relatos de manifestações dessa levedura no homem e em animais, com progressivo reconhecimento do agente como patógeno relacionado à infecção do sistema nervoso central (BRASIL, 2012).

Em 1949, Evans identificou os sorotipos A, B e C, com base em diferente reatividade capsular frente a soros hiperimunes, sendo o sorotipo D descrito posteriormente. A partir de 1980, na era AIDS, ocorreu aumento marcante da criptococose oportunística em todo o mundo, o que gerou interesse e marcada expansão da pesquisa sobre esse agente (BRASIL, 2012).

Os primeiros isolados de *C. neoformans* em solo, madeira em decomposição, *habitat* de aves e, particularmente, excrementos de pombos foram obtidos no final do século XIX, fundamentando o conceito da origem ambiental do processo infeccioso (EMMONS, 1955). Outros *habitats* também foram descritos, como ninhos e solos contaminados, tornando-se evidente a distribuição cosmopolita e urbana do fungo e da micose (LAZÉRA et al., 2000).

Na Austrália, em 1990 ocorreu o primeiro isolamento de *C. neoformans* var. *gattii* (*C. gattii* nomenclatura atual), que foi associado a restos de eucaliptos (ELLIS; PFFEIFER, 1990). Posteriormente, sucessivos trabalhos realizados no Brasil demonstraram que ambas as variedades, *C. gattii* e *C. neoformans*, estavam associados a vários *habitats* naturais representados por madeira em decomposição, em árvores tropicais, tanto em ambientes urbanos como rurais e silvestres (BRASIL,

2012). Essas espécies são frequentemente encontradas em diferentes exemplares de árvores no Brasil, como *Cassia grandis* (cassia rosa), *Senna multijuga* (cassia amarela), *Ficus microcarpa* (ficus), *Sygygium jambolana* (jambolão), *Theobroma cacao* (cacaueiro) e *Caesalpinia peltophorides* (sibipiruna), o que demonstra não haver um *habitat* natural específico, estando presente em diferentes regiões brasileiras incluindo árvores nativas das florestas Atlântica e Amazônica (BRASIL, 2012).

Ambas as espécies são capazes de produzir a enzima lacase, responsável pela produção de melanina, protegendo a levedura dos raios ultra violeta do sol, permitindo a colonização da madeira, principalmente em avançado estado de decomposição. Sua distribuição geográfica por muito tempo foi considerada restrita a regiões tropicais e subtropicais. Entretanto esse paradigma atualmente foi quebrado, uma vez que se relatou a ocorrência de *C. gattii* em regiões de clima temperado (BALTAZAR; RIBEIRO, 2008).

No Brasil, devido às condições ambientais e ao vasto território, observa-se a ocorrência de uma exuberante biodiversidade microbiológica, encontrando-se uma grande diversidade de fungos, que são capazes de crescer em diferentes locais, colonizando árvores vivas ou matéria orgânica do tronco de espécies vegetais mortas (SILVA, 2014).

2.2 Agente etiológico

Cryptococcus neoformans e *C. gattii* são fungos patogênicos causadores da Criptococose em diferentes espécies de animais, como mamíferos placentários terrestres, marinhos, marsupiais, cetáceos, aves e répteis (PINTO, 2010).

As células de *Cryptococcus* apresentam morfologia com características marcantes, como: parede espessa, podendo apresentar multi brotamento e é envolta em uma cápsula de natureza mucopolissacarídica (KWON-CHUNG et al., 1982).

A Identificação do *Cryptococcus* é feita a partir de um conjunto de características fisiológicas e bioquímicas. Como primeiro fator de virulência descrito para os agentes, a cápsula é composta de no mínimo dois polissacarídeos: glucuronoxilomanana e galactoxilomanana, e uma pequena proporção de manoproteínas, que têm grande número de efeitos no hospedeiro, tais como

reduzida resposta de anticorpos, inibição da migração de leucócitos e da fagocitose (BUCHANAN; MURPHY, 1998).

Além da cápsula, a produção de pigmentos semelhantes à melanina é outro fator de grande importância para caracterização do gênero *Cryptococcus*. Esse pigmento está localizado na parede celular do fungo e contribui para a virulência e manutenção da integridade da parede celular (KWON-CHUNG et al., 1982).

O interesse em aspectos fenotípicos, tais como diâmetro de cápsula, hidrólise de ureia, atividade fenoloxidase, vem aumentando por constituírem a virulência do fungo (BUCHANAN; MURPHY, 1998).

A transmissão da criptococose entre humanos é raramente documentada e a presença comum de *C. neoformans* no ambiente indica que a infecção humana é provavelmente adquirida de fontes ambientais (CASALI et al., 2001).

2.3 Epidemiologia

Mundialmente a criptococose por *C. neoformans* atinge indivíduos imunocomprometidos acompanhando o sexo e a idade dos grupos de risco. Entretanto nas regiões Norte e Nordeste do Brasil predominam casos de criptococose em indivíduos sem evidência de imunossupressão, tanto do sexo masculino quanto do feminino, HIV negativos, causados por *C. gattii*, comportando-se como endemia regional (BRASIL, 2012).

A infecção criptocócica tem distribuição mundial, sem uma área endêmica definida. Sua prevalência varia de 2,9% a 13,3% representando assim importante causa de mortalidade de indivíduos com AIDS, apesar do tratamento específico (COSTA et al., 2014). Em 2015 na América Latina, a estimativa de casos de meningite criptocócica foram de 10.000 casos/ano (VIDAL; BOULWARE, 2015).

Criptococose é uma patologia estudada há mais de cem anos (desde 1894). No Brasil, segundo dados do SUS, o período de 2000 a 2007, foi responsável pela maior prevalente em termos de internação, totalizando 4.558 casos. Estima-se ainda uma prevalência associada a AIDS entre 8% a 12% em centros de referência da região sudeste, perdendo apenas para a candidíase (BRASIL, 2012).

Apresenta-se como a segunda causa de mortalidade entre as micoses sistêmicas e possui, aproximadamente, letalidade na faixa de 45% a 65%. No Brasil,

os dados sobre essa enfermidade são conhecidos a partir de análises de série de casos, diagnosticados em alguns centros regionais ou por meio de dados indiretos obtidos no programa de AIDS (COUTINHO et al., 2002).

Os agentes etiológicos *C. neoformans* e *C. gattii* diferenciam-se epidemiologicamente, pois o primeiro tem caráter oportunista, com distribuição cosmopolita e com maior frequência isolado em habitats de pombos, acometendo imunossuprimidos, já o *C. gattii* se comporta como patógeno primário em imunocompetentes, sendo considerado menos virulento por alguns autores (PASA, 2011). Entretanto Moretti e colaboradores (2008), advertem que em áreas endêmicas por *C. gattii* observa-se também associação deste patógeno com a AIDS, enquanto *C. neoformans* pode causar infecção fatal em pessoas aparentemente normais (MORETTI et al., 2008).

A criptococose é descrita em diversos estados do Brasil, como Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Roraima, Amazonas, Piauí, Maranhão, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Rio Grande do Sul, sendo *C. neoformans* prevalente nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Já o *C. gattii* é endêmico no Pará, Maranhão, Piauí e outros estados nordestinos, provocando doença em indivíduos imunocompetentes (AMARO, 2006; MENDES, 2009).

A meningoencefalite criptocócica ocorre em nativos das regiões norte e nordeste, incluindo jovens e crianças, com elevada morbidade e letalidade (37 a 49%), revelando padrões regionais marcadamente distintos da criptococose por *C. neoformans*, amplamente predominante nas regiões sudeste e sul do país (BRASIL, 2012).

Em indivíduos do sexo masculino a infecção ocorre com maior frequência em torno de 78% dos casos, principalmente em adultos (PASA, 2011). As crianças também podem ser infectadas, conforme se encontra demonstrada a ocorrência em áreas endêmicas, como o Norte e Nordeste do Brasil (OLIVEIRA et al., 2004). Segundo Moretti e colaboradores (2008), a maior casuística da infecção ocorre em crianças imunocompetentes oriundas da região norte do Estado do Pará.

Por não ser uma doença de notificação compulsória, é difícil estabelecer a real situação da doença no Brasil (BRASIL, 2012).

2.4 Patogenia

Doença fúngica de caráter oportunista, pode apresenta-se de forma localizada e/ou disseminada, atingindo os pulmões, tornando-se muitas vezes fatal no homem, principalmente quando afeta o sistema nervoso central (SNC) (PINTO, 2010).

A criptococose é adquirida, geralmente, pela via aerógena, através da inalação de propágulos do fungo, que se alojam primariamente nos pulmões, podendo espalhar-se através da corrente sanguínea ou linfática, tendo tropismo pelo SNC, Cichon et al., (2011), manifestando normalmente meningite devido à predileção do agente por receptores neuronais, tipo dopamina (DARZE et al., 2000). Porém a incidência da meningite criptocócica vem diminuindo nos últimos anos devido à terapia antirretroviral altamente eficaz. No entanto, a distribuição gratuita da medicação é pouco aplicada mundialmente, contribuindo para a severidade dos casos (DARZÉ et al., 2000).

Tecidos extrapulmonares, como pele, olhos, miocárdio, ossos, articulações, pulmões, próstata e trato urinário podem ser acometidos, mas em regra o SNC é o local mais atingido pela doença, sob-forma de meningoencefalite, é a manifestação mais grave da doença (BAILLY et al., 1991). A criptococose cutânea primária é rara e pode ocorrer por inoculação transcutânea (SCAIN, 2011).

A meningite causada pelo *C. neoformans* é uma das formas mais graves da doença. A grande quantidade de antígenos circulantes do fungo muda a osmolaridade do líquido cefalorraquidiano, alterando a viscosidade e a absorção, acarretando um aumento da pressão intracraniana causando dores de cabeça e diminuição da acuidade visual. A produção de manitol pela levedura contribui para o aumento dessa pressão (PEREIRA; BARROS, 2012).

A virulência de *C. neoformans* e *C. gattii* está associada à produção de oxidases e de proteases, bem como a propriedades antifagocíticas dos polissacarídeos capsulares. São considerados fatores de virulência a cápsula, o crescimento a 37° C, a produção de melanina e a atividade urease (BUCHANAN; MURPHY, 1998). A atividade urease tem sido implicada como fator primário na patogênese da doença e sua atividade pode ser espécie e/ou sítio de infecção específica (BUCHANAN; MURPHY, 1998).

Pinto (2010), também relata que, ao longo da última década, as doenças fúngicas têm aumentado devido à expansão da população de imunodeprimidos, principalmente em países em desenvolvimento.

2.5 Aspectos clínicos

Criptococose é uma micose sistêmica, causada pela inalação de basidiósporos ou leveduras desidratadas de duas espécies de *Cryptococcus*: o *C. neoformans* e o *C. gattii*. (BUCHANAN; MURPHY, 1998).

Os sítios mais acometidos pela doença são SNC, pulmões, pele, próstata e olho. Por outro lado, em pacientes infectados pelo HIV com doença avançada e naqueles com imunodepressão grave induzida por glicocorticóides podem também ser afetados adrenais, coração, fígado, linfonodos, articulações e rins (JUFFERMANS et al., 2003).

Entre as infecções fúngicas emergentes de significativa morbiletalidade, a criptococose, principalmente sob a forma de meningoencefalite secundária ao processo pulmonar, nem sempre é diagnosticada clinicamente, tanto em indivíduos imunodeprimidos como imunocompetentes (EGHWRUDJAKPOR; ALLISON, 2009).

C. gattii causa infecções respiratórias e disseminadas, acometendo predominantemente indivíduos imunocompetentes. Classicamente, é limitado aos trópicos e subtrópicos, sendo comumente isolado a partir de reservatórios ambientais, como o *Eucalyptus camaldulensis* e outras espécies de árvores (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006).

Nos últimos anos, observa-se o aumento da criptococose afetando tanto o homem como os animais, sendo considerada atualmente a doença com maior morbidade e mortalidade entre os pacientes soropositivos (QUEIROZ et al., 2008).

Ainda que a criptococose tenha baixa incidência em relação a outras enfermidades fúngicas como candidíases, por exemplo, sua importância é grande dado suas recidivas e sequelas, além das altas taxas de mortalidade (LIN; HEITMAN, 2006).

Ambas causam meningoencefalite, de evolução grave e fatal, acompanhada ou não de lesão pulmonar evidente, fungemia e focos secundários para pele, ossos, rins, supra-renal, entre outros (MORETTI et al., 2008).

Em animais os aspectos clínicos da cryptococose podem apresentar-se em quatro síndromes: a síndrome respiratória, síndrome neurológica, síndrome ocular e síndrome cutânea (MARCASSO et al., 2005).

Na síndrome respiratória incluem estertores respiratórios, corrimento nasal mucopurulento, seroso ou sangüinolento, dispnéia inspiratória e espirros. Nessa síndrome, que ocorre com mais frequência nos felinos domésticos, observa-se a formação de massas firmes ou pólipos no tecido subcutâneo, principalmente sobre a região nasal, conferindo um aspecto característico de “nariz de palhaço”. Cães podem apresentar tosse (PEREIRA; COUTINHO, 2003).

A síndrome neurológica manifesta-se principalmente nos cães como uma meningoencefalomielite, estando os sinais clínicos relacionados ao local da lesão (MARCASSO et al., 2005). Observa-se principalmente depressão, desorientação, vocalização, diminuição da consciência, ataxia, espasticidade, andar em círculos, paresia, paraplegia, convulsões, anisocoria, dilatação pupilar, déficit visual, cegueira, surdez, perda de olfato dor cervical (PEREIRA; COUTINHO, 2003).

Na síndrome ocular os achados clínicos mais frequentemente observados são uveíte anterior, coriorretinite granulomatosa, hemorragia de retina, edema papilar, neurite óptica, midríase, fotofobia, blefarospasmo, opacidade de córnea, edema inflamatório da íris e/ou hifema, cegueira (LARSSON et al., 2003).

A síndrome cutânea ocorre preferencialmente nos gatos, sendo pouco comum em cães. As lesões estão localizadas principalmente na pele da cabeça e pescoço dos gatos. As lesões cutâneas observadas correspondem a erosões e ulcerações, as quais podem ser nasais, linguais, palatinas, gengivais, labiais, podais e no leito ungueal (MARCASSO et al., 2005; LARSSON et al., 2003).

2.6 Tratamento

A criptococose é uma das micoses sistêmicas de mais fácil diagnóstico por apresentar marcado tropismo neurológico, abundância de elementos fúngicos no líquido e nas lesões, presença de cápsula característica, diagnóstico imunológico e

coloração tecidual específica. A levedura pode ser vista no escarro, lavado brônquico, líquido cefalorraquidiano (LCR), pus de abscesso, urina, aspirados de medula óssea e de gânglios e fragmentos de tecidos, com grande sensibilidade (MORETTI et al., 2008).

Os casos de criptococose diminuíram ao longo dos anos 90, primeiramente pela introdução dos azóis (antifúngicos utilizados no tratamento de infecções fúngicas graves) e posteriormente pela introdução da *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART), uma combinação de várias drogas antirretrovirais, utilizadas no tratamento da AIDS, popularmente conhecido como “coquetel antirretroviral” (PINTO, 2010).

O tratamento em humanos, é de acordo com o estado imunitário do paciente, inicia-se com anfotericina B e prossegue com a fase de consolidação e manutenção com fluconazol. Durante o período de manutenção pode ocorrer reativação de células do agente etiológico, presentes em focos quiescentes como pulmão e próstata, que poderiam justificar a ocorrência de recidivas (MITCHELL; PERFECT 1995).

A exposição longa à medicação, em particular o fluconazol, pode provocar seleção de células menos sensíveis ao fármaco, ocasionando o surgimento de resistência secundária associada à falha terapêutica (PEREA et al., 2002).

Na Medicina Veterinária o tratamento recomendado consiste de antifúngicos sistêmicos como: anfotericina B, fluocitosina, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, ministrados de forma isolada ou em associação com outras drogas, como: Cetoconazol-fluocitosina, anfotericina B-fluocitosina (LARSSON et al., 2003).

No entanto, a utilização da anfotericina B, cetoconazol e flucitosina para o tratamento da criptococose, quando da localização neurológica não geram resultados satisfatórios, por não alcançarem concentrações eficazes sem a ocorrência de efeitos adversos. Determinados triazóis, como o itraconazol e o fluconazol apresentam alta disponibilidade, quando administrados por via oral e com boa penetração no sistema nervoso central, entretanto, a utilização desses fármacos ainda não foi amplamente testada, sendo desconhecido o tempo de tratamento necessário, bem como seus efeitos colaterais (PEREIRA; COUTINHO, 2003)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo foi identificar a presença de microfocos de *C. neoformans* e *C. gattii*, a fim de minimizar a contaminação ambiental, a partir de amostras ambientais da cidade de Penápolis – SP.

REFERÊNCIAS

- AMARO, M. C. O. **Caracterização de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* quanto à susceptibilidade a fluconazol**. 2006. 80.f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, 2006.
- BAILLY, M. P.; BOIBIEUX, A.; BIRON, F.; DURIEU, I.; PIENS, M. A.; PEYRAMOND, D.; BERTRAND, J. L. Persistence of *Cryptococcus neoformans* in the prostate: failure of fluconazole despite high doses. **Journal Infectious Diseases**, v. 164, n. 2, p. 435-436, 1991.
- BALTAZAR, L. M.; RIBEIRO, M. A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 449-453, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância e epidemiológica da Criptococose**. Brasília, DF: MS, 2012. 18 p.
- BUCHANAN, K.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 71-83, 1998.
- CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. *Cryptococcosis*. **Infectious Diseases Clinics North America**, v. 20, n. 3, p. 507-544, 2006.
- CASALI, A. K.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 4, n. 20, p. 34-37, 2001.
- CICHON, M.; VICENTE, V. A.; MURO, M. D.; BORDIGNON, G. P. F.; QUEIROZ-TELLES, F. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de amostras 48 ambientais de Curitiba e região metropolitana (Paraná, Brasil) e testes de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas. **Revista Brasileira de Análises Clínica**, v. 43, p. 176-179, 2011.
- COSTA, R. C.; LULI, F. B. D.; CARNEIRO, J. R.; CARDOSO, A. M. Infecções fúngicas em pacientes HIV positivos: revisão da literatura sobre criptococose e histoplasmoses. **Estudos**, v. 41, n. 4, p. 843-854, 2014.
- COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980- 1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 1441-1454, 2002.
- DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. The clinical laboratory characteristics of 104 cases of cryptococcal meningoencephalitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 1, p. 21-26, 2000.

ELLIS, D. H.; PFFEIFER, T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans*.var. *gattii*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1942-1644, 1990.

EGHWRUDJAKPOR, P. O.; ALLISON, A. B. Neurocryptococcosis in a 10-year-old immunocompetent girl. **Acta Neurochirurgica**, v.151, n. 6, p. 711–712, 2009.

EMMONS, C.E. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **American Journal Hygiene**, v. 62, n. 3, p. 227-232,1955.

GOMES, F. S.; SARMENTO, D. N.; SANTO, E. P. T. T.; SILVA, S.H.M. Quimiotipagem e caracterização fenotípica de *Cryptococcus* isolados em Belém, Estado do Pará. **Revista Pan-Amaz Saúde**, v. 1, n. 4, p. 43-49, 2010.

JUFFERMANS, N. P.; VERBON, A.; VAN, D. P. T. Diabetes Insipidus as a complication of cryptococcal meningitis in na HIV infected patients. **Scandinavian Journal Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 307-308, 2003.

KOMMERS, G. D.; SOUZA, T. M.; SOUTO, M. A. M.; LA CORTE, F. D.; BARROS, C. S. L. Granulomatous cryptococcal pneumonia in a horse. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 938-940, 2005.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT; J. E. Improved diagnostic medium for separation, of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535-537, 1982.

LARSSON, C. E.; OTSUKA, M.; MICHALANY, N. S.; BARROA, P. S. M.; GAMBALE, W.; SAFATLE, A. M. V. Canine ocular cryptococcosis: a case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 533-538, 2003.

LAZÉRA, M. S.; SALMITO, C. M. A.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, n. 5, p. 379-83, 2000.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 69-105, 2006.

MARCASSO, R. A.; SIERRA, S.; ARIAS, M. V. B.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; YAMAMURA, A. A. M.; BIASI, F.; LOPES, B. A.; AMUDE, A. M.; CORTÊZ, D. E. A. Criptococose no sistema nervoso de cães - relato de três casos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 2, p. 229-238, 2005.

MENDES, F. E. S. **Correlação entre a susceptibilidade in vitro e a atividade in vivo do fluconazol em modelo murinho de infecção cerebral causada por *Cryptococcus gattii***. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade Vale Do Rio Doce, Governador Valadares, 2009.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS: 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995.

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, n. 5, p. 385- 390, 2000.

MORETTI, M. L.; RESENDE, M. R.; LAZÉRA, M. S.; COLOMBO, A. L.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Consenso em criptococose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n. 5, p. 524-544, 2008.

OLIVEIRA, B. M. T.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F. A.; LAZERA, M. S.; LENGELER, K. B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I. N.; PAULA, C. R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1356-9, 2004.

PAPPALARDO, M. C.; MELHEM, M.S. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 6, p. 299-305, 2003.

PASA, C. R. **Tipagem molecular e suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* isolados de pacientes em Hospital Universitário com investigação domiciliar**. 2011. 125 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

PEREIRA, A. P. C.; COUTINHO S. D. A. Criptococose em cães e gatos – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v. 8, n. 45, p. 24-32, 2003.

PEREA, S.; PATTERSON, T. E. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 9, p. 1073-1080, 2002.

PEREIRA, T. C. D.; BARROS, R. A. M. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: Perspectivas sobre a eco-epidemiologia e novos nichos ecológicos. **Faciter Revista Científica**, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2012.

PINTO, L. I. S. **A criptococose meníngea em doentes com infecção de HIV**. 2010. 31 f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina do Porto, Porto, 2010.

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

RYAN, M. J.; WYAND, D. S. *Cryptococcus* as a cause of neonatal pneumonia and abortion in two horses. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 2, p. 270-272, 1981.

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica contemporânea. In: ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. **Micologia Médica: A Luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004, p.50-62.

ROZENBAUM, R., GONCALVES, A. J. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 369-80, 1994.

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.

SILVA, B. N. S. **Seleção de fungos apodrecedores de madeiras e caracterização de basidiomicetos associados à podridão de tecidos de árvores vivas**. Lavras: UFLA, 2014.

VIDAL, J. E.; BOULWARE, D. R. Lateral flow assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, 38-45, 2015.

CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO DE *Cryptococcus* spp. em AMOSTRAS AMBIENTAIS DE PENÁPOLIS, SP

Resumo - *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são microrganismos com potencial patogênico que afetam animais silvestres, domésticos e o homem. O presente estudo teve como objetivo identificar a presença de microfocos de *C. neoformans* e *C. gattii*. ambientais na cidade de Penápolis-SP. Foram coletadas 100 amostras de árvores localizadas em praças e vias públicas da região urbana do município. O cultivo microbiano foi realizado em placas de Ágar semente de Níger e *Sabouraud* dextrose acrescido de cloranfenicol e incubadas a 30°C em estufa microbiológica por 5 dias. As colônias sugestivas para *Cryptococcus* spp. foram analisadas microscopicamente por meio de coloração com tinta nanquim e lactofenol azul de algodão e, posteriormente, submetidas aos testes: Hidrólise da ureia, Termotolerância e Ágar CGC (L-canavanina-glicina-azul de bromotimol). A análise dos resultados revelou que 14% (14/100) dos cultivos foram positivos para a espécie *C. gattii*. Outras leveduras correlacionadas também foram identificadas, como *Rhodotorula* sp. e *Candida* sp. As espécies de árvores que apresentaram cultivos positivos foram: *Ficus benjamina*, *Syzygium cumini*, *Caesalpinia pluviosa*, *Licania tomentosa*, *Bauhinia forficata*, *Pachira aquática*, *Artocarpus heterophyllus*, *Samanea tubulosa* e *Lagerstroemia speciosa*. O *C. gattii* encontra-se associado a espécies vegetais mantendo-se desvinculado do binômio fungo-ave. A identificação de microfocos ambientais é de extrema importância para o desenvolvimento de medidas profiláticas de interesse em Saúde Única.

Palavra-chave: *Cryptococcus*. Micoses sistêmicas. Tronco de árvores.

ABSTRACT

ISOLATION OF *Cryptococcus* spp. in ENVIRONMENTAL SAMPLES OF PENÁPOLIS, SP

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are microorganisms with pathogenic potential that affect wild animals, domestic animals and humans. The present study had as objective to identify the presence of microfocus of *C. neoformans* and *C. gattii* ambientais in the city of Penápolis-SP. A hundred samples of trees located in squares and public roads of the urban area of the municipality were collected. Microbial culture was carried out on Niger and Sabouraud dextrose agar plates plus chloramphenicol and incubated at 30°C in a microbiological oven for 5 days. The colonies suggestive of *Cryptococcus* spp. were analyzed microscopically by staining with nanquim ink and cotton-blue lactophenol, and subsequently submitted to the tests: urea hydrolysis, thermo-tolerance and CGC agar (L-canavanine-glycine-bromothymol blue). Analysis of the results revealed that 14% (14/100) of the cultures were positive for *C. gattii* species. Other correlated yeasts were also identified, such as *Rhodotorula* sp. and *Candida* sp. The species of trees that presented positive cultures were *Ficus benjamina*, *Syzygium cumini*, *Caesalpinia pluviosa*, *Licania tomentosa*, *Bauhinia forficata*, aquatic *Pachira*, *Artocarpus heterophyllus*, *Samanea tubulosa* and *Lagerstroemia speciosa*. *Cryptococcus gattii* is associated with plant species, remaining unlinked from the fungus-bird binomial. The identification of environmental microfocus is extremely important for the development of prophylactic measures of interest in One Health concept.

Keywords: *Cryptococcus*. Systemic mycoses. Tree trunk.

1 INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Cryptococcus* são basidiomiceto em forma de levedura, que apresentam formas arredondadas e ou ovais pertencentes à classe *Blastomycetes* e família *Cryptococcaceae* (MACHADO, 2015). Embora existam mais de 70 espécies incluídas no gênero, as leveduras patogênicas responsáveis pela criptococose consistem em duas espécies, o *Cryptococcus neoformans* e o *Cryptococcus gattii* (KURTZMAN et al., 2011), as quais diferem entre si em aspectos bioquímicos, biológicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (QUEIROZ et al., 2008).

No Brasil, a doença não é de notificação compulsória e estima-se uma prevalência de 12%, principalmente relacionada ao *C. neoformans*, estando associado a indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), apresentando uma letalidade entre 35 a 40%. Diferentemente do *C. neoformans*, o *C. gattii* apresenta-se distribuído por todo o território nacional, acometendo preferencialmente indivíduos provenientes das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país, independente do estado imunológico (BRASIL, 2012).

Tanto o *C. neoformans* como o *C. gattii* são encontrados em uma variedade de nichos, incluindo substratos orgânicos, excretas de pombos (*Columbia livia domestica*) outras aves e fezes de morcegos (MARINHO et al., 2010; TENCATE et al., 2012; ARAUJO JUNIOR et al., 2015). Em diferentes *habitats*, essas espécies tem sido isolada em construções antigas, baratas, ninhos de vespa, suco de fruta fermentado, microbiota intestinal de cavalo, leite, cavidade nasal e pelo de cães, gatos, coalas, recintos de coelhos, buracos de tatus, solo (LAZERA et al., 1998; PASSONI, 1999), várias espécies de árvores em decomposição (LAZERA et al., 2000; KIDD et al., 2004).

Segundo o Ministério da Saúde, Brasil (2012), apesar das divergências entre essas espécies, ambas podem ocorrer isoladamente ou simultaneamente em um só *habitat* natural, estando elas relacionadas com processos de decomposição da madeira.

Em muitos casos, na literatura compulsada o *C. neoformans* encontra-se vinculado ao pombo, estabelecendo-se uma complexa interação entre o fungo, o ambiente e o hospedeiro (SWINNE, 1979; IDNURM et al., 2005). Entretanto, durante

o seu ciclo biológico, há de se considerar a eventualidade com que o *C. neoformans* é eliminado com as excretas das aves e, devido à ação do vento, há consequentemente o carreamento de propágulos para outras excretas adjacentes que não necessariamente contaminadas. Assim ocorre a disseminação (CASADEVALL; PERFECT, 1998), ocasionando novos microfocos, ampliando-se os riscos de contaminação ambiental (MARINHO et al., 2010).

Por muito tempo a presença do *C. gattii* esteve associado ao *Eucalyptus* spp., uma vez que seu primo isolamento ocorreu em restos de vegetais dessa espécie na Austrália (CATTANA et al., 2014), porém, atualmente, verifica-se que o fungo encontra-se presente em muitas espécies de vegetais, estando amplamente disseminado na natureza (LAZERA et al., 1996). No Brasil, o *C. gattii* foi encontrado em árvores tropicais como cássia, oiti, ficus, mulungu e “guetarda” (LAZERA et al., 1998; LAZERA et al., 2000; FORTES, 2001). Segundo pesquisadores, *C. gattii* foi isolado por toda a região amazônica brasileira e colombiana, a partir de amostras coletadas de várias espécies de árvores nativas (MITCHELL et al., 2011), como também de madeira em estado de decomposição, e em outros substratos (LAZERA et al., 1998; LAZERA et al., 2000; FORTES, 2001).

A maior ocorrência do *C. gattii* é observada em regiões tropicais e subtropicais do planeta, diferentemente do *C. neoformans*, que se encontra distribuído de forma cosmopolita (SWINNE, 1979; IDNURM et al., 2005). Porém o *C. gattii* já foi isolado em áreas frias, como na Ilha de Vancouver no Canadá (KIDD et al., 2004), área de clima frio e temperado, o que sugere que o microrganismo pode se adaptar a diferentes temperaturas, desde 37°C a 10°C negativos (FRANZOT et al., 1999; GALANIS et al., 2010).

A preocupação com a ocorrência de *C. gattii* em microfocos ambientais fundamenta-se no caráter de virulência do patógeno que, geralmente, atua como agente primário a criptococose, independente da imunossupressão do indivíduo (CATTANA et al., 2014; ESCANDON; CASTANEDA, 2015; SMITH et al., 2015), podendo permanecer quiescente por um longo período (CORREA et al., 1999), manifestando-se em fase tardia da vida do hospedeiro (MACHADO, 2015).

A importância de se identificar nichos ambientais em áreas urbanas, justifica-se pelo desenvolvimento de medidas profiláticas que visem minimizar a contaminação ambiental por propágulos, reduzindo assim a formação de novos nichos e novas áreas contaminadas (MARINHO et al., 2010). Kobayashi et al.,

(2005), também relataram a importância da identificação dos microfocos ambientais de *Cryptococcus* spp. como investigação de fatores de risco à saúde pública, uma vez que a inalação do propágulo infectado é a principal via de infecção para a criptococose (CATTANA et al., 2014; ESCANDON; CASTANEDA, 2015; SMITH et al., 2015).

O presente estudo teve como objetivo identificar a presença de microfocos de *C. gattii* e *C. neoformans*, a partir de amostras ambientais da cidade de Penápolis – SP.

2 METODOLOGIA

As amostras ambientais foram coletadas em perímetro urbano do município de Penápolis, S.P., que se encontra localizado na região Noroeste do Estado de São Paulo (Figura 1), com Latitude 21°25'11S e Longitude 50°04'39 W, à margem esquerda do Tietê (Bacia Hidrográfica do Baixo Tietê). O município dista 480 Km da capital, apresentando área total de 710,4 km² e altitude de 416 m (PREFEITURA MUNICIPAL DE PENÁPOLIS, 2017) (Figura 1). Apresenta clima tropical, com temperatura média anual de 23°C, composta por 2 estações climáticas que estão compreendidas durante o período de outubro a abril, quando há ocorrência de estação quente e chuvosa, e de maio a setembro, com clima seco e frio (ROSSETTI, 1994). Os locais das coletas são pontos representativos e equidistantes entre si, dentro da área total da cidade de Penápolis; escolhidos ao acaso, desde que apresentassem fluxo significativo de animais domésticos (cães) e pessoas e presença de vegetação, tais como: praças, parques, e ruas de atividade de lazer.

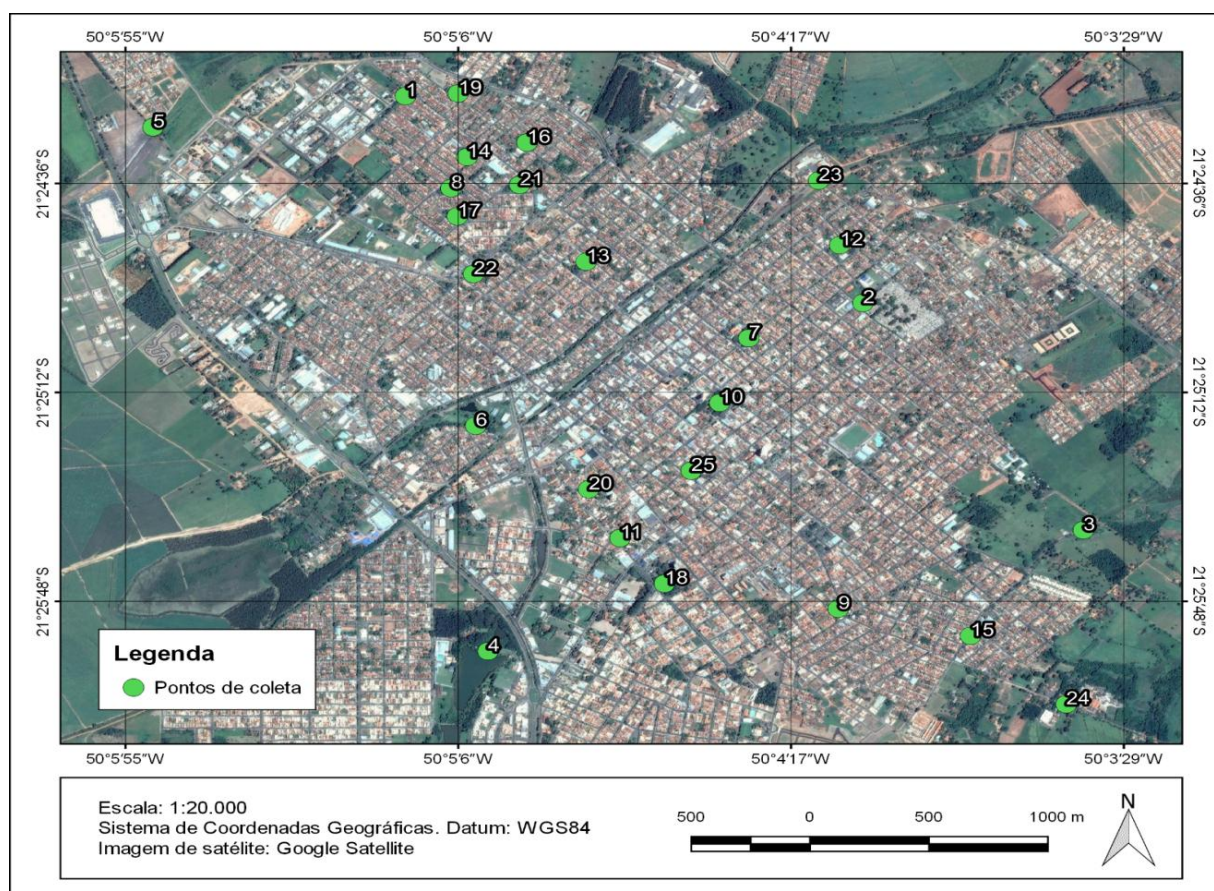
Figura 1 - Mapa do estado de São Paulo identificando a cidade de Penápolis na cor vermelha.



Fonte: Domínio público/Google

Foram coletadas 100 amostras ambientais no período de Fevereiro a Julho de 2017, em 25 diferentes locais (Tabela 1 e Figura 2), material vegetal proveniente de 22 espécies de árvores, como fragmentos de troncos e putrefato de ocos. As amostras foram obtidas por raspagem utilizando-se curetas individuais e estéreis e frascos plásticos com tampa de rosca, tipo coletor, e armazenadas em isopor. Posteriormente, foram encaminhadas ao Laboratório para serem processadas. Ressalta-se ainda que foram adotadas em todos os momentos do trabalho os protocolos de biossegurança, tais como: higienização das mãos, uso de EPIs (luva e máscara descartável), e jaleco de manga longa.

Figura 2- Mapa com a localização dos pontos de coleta das amostras ambientais



Fonte: Datum

Tabela 1 - Identificação da localização geográfica dos pontos de coleta

Identificação	Locais públicos
01	Avenida Antônio Borges Boucinha
02	Avenida Eduardo de Castilho
03	Avenida Leopoldino Alves Cardoso
04	Praça Laonte Rossi Vasconcelos
05	Clube de Campo Lago Azul
06	Estrada Municipal Boa Esperança
07	Parque Municipal Maria Chica
08	Praça 9 de julho
09	Praça Chico Mendes
10	Praça Daniel Rodrigues
11	Praça Dr. Carlos Sampaio Filho
12	Praça Frei Cirilo Bergamasca
13	Praça Igreja Nossa Senhora Aparecida
14	Praça Igreja Nossa senhora Fátima
15	Praça Igreja Sagrada Família
16	Praça Igreja Santa Terezinha
17	Praça João Caparoz Peres

Tabela 1 - Identificação da localização geográfica dos pontos de coleta

(continua)

Identificação	Locais públicos
18	Praça Jordano Anhesini
19	Praça Nobuyoshi Obara
20	Praça Orentino Martins
21	Praça Sebastião Rodrigues
22	Praça Sebastião Nogueira da Silva
23	Rua Adolpho Reche
24	Rua Altino Vaz de Mello
25	Rua Brasil

As amostras ambientais foram processadas em câmara de fluxo laminar, onde 1g do material foi macerado utilizando-se pistilo e gral, sendo posteriormente acondicionado em frasco Erlenmeyer contendo 50mL de solução salina estéril a 0,9% com cloranfenicol (100 µg/mL). As suspensões foram homogeneizadas em vórtex por 5 minutos após a vedação do frasco com *Parafilm®* e posteriormente deixadas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo então transferidos 10 mL do sobrenadante para tubos de ensaio, para serem centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. Da suspensão resultante foram descartados 9 mL do sobrenadante sendo o sedimento homogeneizado no volume restante, de onde foram retiradas amostras que imediatamente foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar semente de Níger e tubos de Ágar Sabouraud 4% dextrose acrescido de cloranfenicol. Posteriormente, os cultivos foram incubados a temperatura de 30°C em estufa bacteriológica, em atmosfera de aerobiose por um período de cinco dias (MARINHO et al., 2010; ARAUJO JUNIOR et al., 2015).

Os cultivos foram monitorados diariamente e as colônias que apresentaram crescimento sugestivo para levedura foram repicadas em placas contendo ágar semente de Níger, para posterior obtenção de colônias puras (SHIELDS; AJELLO, 1966) e novamente incubadas em temperatura, atmosfera e período supra descritos. As colônias sugestivas para *Cryptococcus* spp., que expressaram a coloração entre creme e marrom, foram novamente repicadas em Ágar Sabouraud dextrose a 4%, para posteriormente serem submetidas aos testes de hidrólise da ureia, termotolerância a 37° e cultivo em ágar CGB (L-canavanina-glicina-azul de bromotimol) (QUINN et al., 1994).

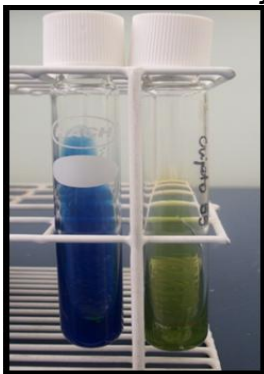
Para análise micromorfológica do fungo, todas as amostras provenientes de culturas leveduriformes foram submetidas à coloração com tinta nanquim e lactofenol azul de algodão.

As colônias que apresentaram crescimento macro e micromorfológico característico para *Cryptococcus* spp. foram semeadas em tubos contendo ureia-ágar-base (CHRISTENSEN, 1946), incubadas a 25° C e observadas diariamente por um período de sete dias. Na prova da ureia, a colônia é hidrolisada pela urease, enzima produzida pela levedura do gênero *Cryptococcus*, resultando em mudança de coloração do meio de amarelo para rosa intenso (MACHADO, 2015).

As colônias com crescimento macro e micromorfológico característico para *Cryptococcus* spp. foram semeadas em tubos contendo ágar Sabouraud e incubados a 37°C (SIDRIM; MOREIRA, 1999), por um período de sete dias.

Para diferenciar as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* foi utilizado o teste de CGB (K-WON-CHUNG et al., 1982) e incubados a 30°C por até 5 dias, sendo monitorados diariamente até a resolução do teste. Foram utilizadas duas amostras de referência, ATCC de *C. neoformans* e *C. gattii*, obtidas junto ao Laboratório de Micologia da FIOCRUZ/RJ como controle positivo. O meio CGB foi utilizado para diferenciação do complexo *C. neoformans* – *C. gattii* (Figura 3). No caso de *C. gattii*, por ser resistente a L-canavanina, o microrganismo cresce alterando a cor do meio para azul-cobalto, uma vez que o fungo utiliza a glicina como única fonte de carboidrato e nitrogênio, gerando assim amônia, substância responsável por alcalinizar o meio e consequentemente a mudança da cor verde para azul cobalto. Diferentemente do *C. neoformans*, que é inibido pela L-canavanina, não sendo capaz de crescer e/ou utilizar a glicina presente no meio, mantendo a cor original (MELO et al., 1993).

Figura 3 - Diferenciação das variedades do *Cryptococcus* pelo teste CGB.



Fonte: Laboratório de Bacteriologia e Micologia – FMVA

Os dados foram submetidos ao Teste de Fisher, sendo adotado o nível de significância de 5% e $p=0.0292$ havendo diferença estatística entre as variáveis (espécie de árvores). Para as variáveis utilizou-se o programa SAS (SAS, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 14 amostras com cultivos positivos para o gênero *Cryptococcus*, 100% apresentaram-se positivas para a espécie de *C. gattii*. Sendo, $p=0.0292$ havendo diferença estatística entre as variáveis (espécie de árvores).

Ao término dos cultivos não foi observada a presença da espécie de *C. neoformans* nas amostras ambientais coletadas, o que pode estar relacionado a medidas públicas adotadas pela Prefeitura de Penápolis referente ao corte e poda de árvores. Durante os meses de janeiro a novembro de 2017, período coincidente ao da coleta de amostras, foram erradicadas 411 árvores de vias públicas da cidade (MENDONÇA, 2018), provocando a diminuição do número de *habitats* para muitas aves, acarretando a diminuição de excretas nesses locais e possivelmente a diminuição de microfocos.

Os fatos expostos poderiam fundamentar nossos resultados de ausência de *C. neoformans*, diferentemente dos relatos de Araujo Junior e colaboradores, (2015), que demonstraram a presença de *C. neoformans* em 16% (8/50) das amostras ambientais cultivadas, assim como Destro (2016), que observou 12% (6/50) dos cultivos positivos.

Os resultados diferem dos obtidos por Baltazar e Ribeiro (2008) na cidade de Vitória (ES), quando foram coletadas 168 amostras provenientes de ocos e cascas de árvores, sendo que apenas 1,2% (2/168) apresentaram isolamento para *C. gattii*, sendo concluído pelos autores que as condições climáticas daquela cidade, situada na região litorânea, com temperatura média elevada, não favoreceria a presença do fungo no ambiente.

Porém estudos realizados em 2009 na Baixada Santista, Ubatuba e Canal de São Sebastião, regiões litorâneas, onde foram coletadas amostras ambientais, identificaram fungos do gênero *Cryptococcus*, confirmando assim a capacidade do

fungo em adaptar-se em temperaturas variadas, diferem dos estudos em Vitória (ES) (RAMALHO, 2009).

Nos estudos a cima com resultados positivos *C. Gattii* demonstram a capacidade do fungo em adaptar-se em diversas condições climáticas, sendo elas em regiões litorâneas como no interior do estado onde as pressão atmosférica pode sofrer alterações de acordo com a localização: Vitória (ES) a pressão atmosférica é 1011hPa, na Baixada Santista 1006hPa, em Ubatuba 1015hPa, no Canal de São Sebastião 1001hPa, em Araçatuba 1007hPa, em Penapolis 1007hPa e Bauru 1012hPa.

As espécies de árvores com isolamento positivo da espécie de *C. gattii* em ordem decrescente foram: *Samanea tubulosa* (Sete Cascas) (3/14); *Bauhinia variegata* (Pata de Vaca) (2/14); *Ficus benjamina* (Figueira-benjamim) (2/14); *Pachita aquática* (Munguba) (2/14); *Syzygium jambolanum* (Jambolão) (1/14); *Caesalpinia pluviosa* (Sibipiruna) (1/14); *Licania tomentosa* (Oiti) (1/14); *Artocarpus heterophyllus* (Jaqueira) (1/14); *Lagers troenia speciosal* (Reseba gigante) (1/14).

A associação dos resultados, entre a espécie fúngica e a árvore- hospedeira, revelam similaridades com os encontrados em estudos (DESTRO, 2016), quando a partir de amostras provenientes da região de Bauru, isolou-se *C. gattii* 12% (6/50) das espécies de *Caesalpinia pluviosa* sin. *C. peltophoroides*, *C. echinata*, *Eucalyptus* spp. e *Ficus elástica* enquanto (ARAUJO JUNIOR et al., 2015), isolou 18% (9/50) a partir de *Sibipiruna*, *Ficus* spp. e *Cassia* spp.

Segundo resultados obtidos neste estudo, o *C. gattii* foi isolado em 40% (9/22) das espécies de árvores pesquisadas, corroborando com a descrição de seu isolamento em diferentes espécies de árvores e de diferentes regiões geográficas do mundo, indicando que sua ocorrência não está estritamente associada a uma determinada espécie de árvore, mas com um nicho especializado resultante da biodegradação natural da madeira (LAZERA et al., 2000).

No presente estudo outros fungos correlacionados, como *Candida* spp. e *Rhodotorula* spp. também foram isolados a partir das amostras ambientais corroborando com estudos (MARINHO et al., 2010; TENCATE et al., 2012; ARAUJO JUNIOR et al., 2015), que mostraram que a manutenção dos fungos no ambiente depende dos nichos de substratos orgânicos como madeira em estado de

degradação, ampliando assim a formação de microfocos com consequente riscos de contaminação humana e ou animal.

Nossos resultados revelaram que não houve associação do *C. gattii* a um nicho específico, nem vegetal nem animal, descaracterizando assim o binômio fungo-hospedeiro, semelhante aos resultados propostos por Passoni (1999). Demonstra-se assim, a importância de se identificarem microfocos ambientais de leveduras com potencial patogênico e de interesse em Saúde Única, ratificando a importância de medidas profiláticas em saúde pública, a fim de minimizar o risco ambiental.

4 CONCLUSÃO

C. gattii encontra-se presente em amostras ambientais, microfocos, provenientes de árvores com material em biodegradação de locais públicos da cidade Penápolis. Pela análise das amostras processadas não foi possível o isolamento do *C. neoformans*.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO JUNIOR, E. C.; TÁPARO, C. V.; UCHIDA, C. Y.; MARINHO, M. *Cryptococcus*: Isolamento ambiental e caracterização bioquímica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 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 Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 449-453, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância e epidemiológica da Criptococose**. Brasília, DF: MS, 2012. 18 p.
- CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*, Washington, DC: **American society for Microbiology Press**, p. 541, 1998.
- CATTANA, M. E.; SOSA, M. L. Á.; FERNÁNDEZ, M.; ROJAS, F.; MANGIATERRA, M.; GIUSIANO, G. Native trees of the Northeast Argentine: Natural hosts of the *Cryptococcus neoformans* *Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, n. 3, p. 188–192, 2014.
- 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, n. 4, p. 461-466, 1946.
- 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, n. 5, p. 505-508, 1999.
- DESTRO, M. M. **Isolamento ambiental e caracterização bioquímica de *Cryptococcus***. 2016. 39 f. Dissertação (mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp. Araçatuba/SP, 2016.
- ESCANDÓN, P.; CASTANEDA, E. Long-term survival of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in stored environmental samples from Colombia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 32, n. 3, p. 197–199, 2015.
- FORTES, S. T. **Fontes sapróbias e sexualidade de isolados clínicos e ambiental de *Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans* do estado de Roraima – Brasil**. 2011. Tese (doutorado)-Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Rio de Janeiro, 2001.
- FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype a isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 838-840, 1999.
- GALANIS, E.; MACDOUGALL, L.; KIDD, S.; MORSHED, M. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999 - 2007. **Emerging Infectious**

Diseases. v. 16, n. 2, 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, n. 10, 2005.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K. H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, K.; KWON-CHUNG, K. J.; MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 101, n. 49, p. 17258-17263, 2004.

KOBAYASHI, C. C. B.; SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; BRITO, S. C.; SILVA, A. C.; SOUSA, E.D.; SILVA, M. R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 4, p. 203-207, 2005.

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

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation, of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535-537, 1982.

LAZERA, M. S.; PIRES, F. D. A.; CAMILLO, C. G.; NISHIKAWA, M. M.; BEZERRA, C. C. F. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of Medical and Animal Mycology**, v. 34, n. 2, p. 127 – 131, 1996.

LAZERA, M. S.; CAVALCANTI, M. A. S.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a pottery tree hollow - evidence for a natural habitat related to decaying wood. **Journal of Medical and Animal Mycology**, v. 36, n. 2, p. 119-122, 1998.

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, n. 5, p. 379-383, 2000.

MACHADO, H. A. S. **Prevalência do antígeno criptocócico utilizando Lateral Flow Assay (LFA) no screening de pacientes com HIV/AIDS**. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado)-Instituto Oswaldo Cruz, Teresina-PI, 2015

MARINHO, M.; TAPARO, C. V.; SILVA, B. G.; TENCATE, L. N.; PERRI, S. H. Microbiota fúngica de passeriformes de cativeiros da região noreoeste do Estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 2, p. 288-292, 2010.

MENDONÇA, T.F. Penápolis tem 45% a mais de verde do que o recomendado.
Folha da Região, Disponível em:

<http://www.folhadaregiao.com.br/2.633/pen%C3%A1polis-tem-45-a-mais-de-verde-do-que-o-recomendado-1.103560>. Acesso 21-1-2018.

MELO, N. T.; LACAZ, C. S.; CILARBEL, C. E.; PEREIRA, A. D.; HEINS-VACCARI, E. M.; FRANÇA-NETTO, A. S.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J. A. Quimiotipagem do *Cryptococcus neoformans*. Revisão da Literatura. Novos dados epidemiológicos sobre a criptococose. Nossa experiência com o emprego do meio de C.G.B. no estudo daquela levedura. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.35, p.469-478, 1993.

MITCHELL, T. G.; CASTANEDA, E. E.; KIRSTEN, N.; WANKE, B.; LAZERA, M. S. Nichos ambientais para *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Em *Cryptococcus: From Humans Pathogen to model yeast*. Editado por HEITMAN J; KOZEL, T. R.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A..**American Society for Microbiology, Washington DC**, p. 237 – 251, 2011.

PASSONI, L. F. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 16, n. 2, p. 77-81, 1999.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE PENAPOLIS. Portal da prefeitura do município de Penapolis. Disponível em: <http://www.penapolis.sp.gov.br/> Acesso em: 30/08/2017.

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

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. Clinical Veterinary Microbiology. London: **Wolfe-mosby**, p. 648, 1994.

RAMALHO, R. F. **Caracterização morfológica e fenotípica de leveduras do gênero *Cryptococcus* com ênfase na pesquisa de *Cryptococcus neoformans* isoladas de amostras de água de mar e areia de três ambientes costeiros do estado de São Paulo: Canal de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba**. 59 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009.

ROSSETTI, J. P. Introdução à economia. Brasil. **Editora Atlas**, v. 16, 1994.

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

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

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

SMITH, I. M.; STEPHAN, C.; HOGARDT, M.; KLAWE, C.; TINTELNOT, K.;

RICKERTS, V. Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in Germany from 2004 - 2013. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 7, p. 719-723, 2015.

SWINNE, D. *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **Annales de la Societe de Medicine Tropicale**, v. 59, n. 3, p. 285-299, 1979.

TENCATE, L. N.; TAPARO, C. V.; CARVALHO, C.; BOSCO, S. M.; QUEIROZ, L. H. Estudo da microbiota fúngica gastrintestinal de morcegos (*Mammalia, Chiroptera*) da região noroeste do estado de São Paulo: potencial zoonótico. **Brasilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 49, n. 2, p. 146-152, 2012.