

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

GUSTAVO SCAIN

**PREVALÊNCIA DE *Cryptococcus neoformans* EM FEZES DE POMBOS
(*Columba livia*) NAS PRAÇAS PÚBLICAS DA CIDADE DE LAGES, SANTA
CATARINA.**

LAGES, OUTUBRO DE 2011

GUSTAVO SCAIN

**PREVALÊNCIA DE *Cryptococcus neoformans* EM FEZES DE POMBOS
(*Columba livia*) NAS PRAÇAS PÚBLICAS DA CIDADE DE LAGES, SANTA
CATARINA.**

Monografia apresentada à Diretoria de Pós-graduação da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, para a obtenção do título de especialista em Análises Clínicas

Orientador: Prof. MSc. Rosiléia Marinho de Quadros

LAGES, OUTUBRO DE 2011

Com amor aos meus pais queridos...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença em cada etapa da minha caminhada até este momento, guiando-me da melhor forma possível, dando saúde, coragem, perseverança para atingir meus objetivos. Peço que continue mostrando o caminho a ser seguido em minha vida.

É difícil agradecer a todas as pessoas que de algum modo nos momentos serenos e ou apreensivos fazem ou fizeram parte da minha vida, por isso primeiramente agradeço a todos de coração.

Aos meus pais, Pedro Scain e Lira Ribeiro Scain, pelo amor, carinho, que não mediram esforços para mais esta etapa de minha realização profissional. Obrigado pela confiança e preocupação comigo nos momentos em que precisei viajar.

A minha irmã, Caroline Scain, que me apoiou e apóia em todas as minhas decisões pessoais e profissionais, obrigado pelo amor, dedicação e companheirismo.

Muito obrigado aos que me ajudaram na realização deste trabalho, futuros biomédicos, Alexandre Lemos de Souza, Caroline Godinho Wolff e Thaianna de Menezes, mais uma vez, muito obrigado, pela disponibilidade, profissionalismo e companheirismo. Ao meu amigo Artur Gabriel Alves Farias, pela força e companhia sempre, de coração, obrigado.

A todos os meus familiares pelo apoio e carinho constante.

Aos meus colegas, que juntos ríamos, trocávamos experiências, em especial à Lívia Bruchchen, pela receptividade.

A minha orientadora, Rosiléia Marinho de Quadros, que aceitou orientar este trabalho, sempre apoiando, incentivando e demonstrando preocupação com meu futuro profissional.

A toda equipe de técnicos dos Laboratórios Básicos da Saúde, da Universidade do Planalto Catarinense.

Ao professor Luiz Cláudio Miletto, muito obrigado pelo auxílio com materiais para a realização dessa pesquisa.

A minha inseparável irmã de coração, Fernanda Ronconi de Liz, pela companhia sempre, nos trabalhos, nas viagens, nas decisões, e principalmente pela coragem de enfrentar comigo um curso de especialização a 209 Km longe de casa.

A todos os meus amigos, que sempre estiveram presentes comigo.

Ao programa de pós-graduação da Universidade do Extremo Sul Catarinense,
pela oportunidade da realização do curso.

“A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e a força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu pra sempre.”

Louis L. Amour

RESUMO

A criptococose é uma das infecções fúngicas oportunistas mais comuns, causada pela levedura capsulada *Cryptococcus neoformans*. O fungo é adquirido pela inalação de propágulos de origem ambiental. Os pombos domésticos (*Columba livia*) estão relacionados a esta infecção, principalmente como reservatórios naturais deste fungo e devido à grande concentração destes animais em ambientes públicos, sobretudo em locais de grande circulação de pessoas. A levedura resiste ao trato intestinal destas aves, permanecendo presente principalmente em fezes secas, podendo entrar em contato com a população, causando infecções, principalmente em imunocomprometidos. O presente trabalho teve por objetivo, identificar a presença do *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos presentes em praças públicas de Lages, SC. Foram analisadas 58 amostras fecais do solo de pombos das praças de maior circulação humana na cidade. Das amostras analisadas 25,86% (15 amostras), foram positivas para o encontro da levedura capsulada. Com este estudo conclui-se, que a condição climática pode ser um fator importante para a disseminação do fungo, já que se faz necessário como meio de sobrevivência da levedura a presença de fezes secas no ambiente. O alto índice pluviométrico ocorrido em Lages durante o período do trabalho pode ter contribuído para a prevalência do fungo nas amostras analisadas, também a higienização diária das praças pode reduzir o acúmulo de excretas dos pombos, o que pode influenciar no mecanismo de sobrevivência do fungo no ambiente.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, Pombos, Praças Públicas

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Representação da Cápsula de <i>C. neoformans</i>	13
Figura 02 - Cultura de <i>C. neoformans</i>	15
Figura 03 - Micromorfologia do <i>C. neoformans</i>	16
Figura 04 - Ciclo de transmissão do <i>C. neoformans</i>	20
Figura 05 - Ciclo de transmissão pulmonar do <i>C. neoformans</i>	21
Figura 06 - (A) Parque Jonas Ramos(3771,40 m ²); (B) Distribuição dos cinco quadrantes	24
Figura 07 - (A) Praça João Costa (3585,96 m ²); (B) Distribuição dos oito quadrantes	24
Figura 08 - (A) Praça João Ribeiro (2585,24 m ²); (B) Distribuição dos seis quadrantes	25
Figura 09 - (A) Praça Siqueira (572,76 m ²); (B) Distribuição dos dois quadrantes....	25
Figura 10 – (A) Praça Joca Neves (682,36 m ²); (B) Distribuição dos três quadrantes	25
Figura 11 - (A) Calçadão Tulio Fiuza de Carvalho (1892,92 m ²); (B) Distribuição dos cinco quadrantes	26
Figura 12 - Coleta de excretas de pombos	27
Figura 13 – PROVA DA UREASE (A) Urease Negativa; (B) Urease Positiva	28
Figura 14 - Alimentação de pombos na Praça João Costa, Lages – SC.....	30
Figura 15 - Crescimento de diferentes espécies fúngicas em Agar BHI modificado. (A) Colônias de <i>C. neoformans</i>	31
Figura 16 - Leveduras de <i>C. neoformans</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Número de quadrantes/amostras por praça	23
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BHI – Brain Heart Infusion

DNA – Ácido desoxirribonucléico

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

LCR – Líquido cefalorraquidiano

PCR – Polymerase Chain Reaction

pH – Potencial hidrogeniônico

RAPD – Random Amplified Polymorphic

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

SNC – Sistema Nervoso Central

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

UNIPLAC – Universidade do Planalto Catarinense

Var - Variedade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	12
2.1 Ciclo de vida	14
2.2 Macromorfologia.....	15
2.3 Micromorfologia	16
3 POMBOS (<i>Columba livia</i>)	17
4 CRIPTOCOCOSE	18
4.1 Manifestações Clínicas.....	18
4.1.1 Meningite Criptocócica	19
4.1.2 Criptococose Pulmonar	20
4.2 Diagnóstico.....	21
4.2.1 Exame Direto.....	21
4.2.2 Cultura.....	21
4.2.3 Sorologia	22
4.2.4 Identificação Laboratorial	22
4.3 Tratamento	22
5 METODOLOGIA	23
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
7 CONCLUSÃO	33
8 REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O *Cryptococcus neoformans* é um fungo leveduriforme encapsulado, que causa infecções em indivíduos imunocomprometidos, sobretudo os infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Segundo Pappas *et al.*(2001), pode haver criptococose em indivíduos sem supressão imune aparente, nesses casos, provavelmente associados a distúrbios no sistema imune como a linfopenia. Casos de transmissão entre humano embora raro, foi descrito após transplante de tecido infectado.

O principal mecanismo de infecção pelo fungo é através da inalação de partículas do microorganismo, onde a levedura pode viver endossapofiticamente em animais como pombos, que atuam como reservatórios, uma vez que estes animais são protegidos devido a sua alta temperatura corporal.

O *C. neoformans* pode ser encontrado em várias fontes ambientais, entretanto, relaciona-se essa espécie, na maioria das vezes, com excretas acumuladas de aves, principalmente pombos domésticos (GRANADOS e CASTAÑEDA, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Devido a alta concentração de *C. neoformans* em fezes de aves, aliada a alta prevalência de aves em áreas urbanas, e a severidade da criptococose em seres humanos, existe um crescente interesse no estudo da relação entre as aves, suas excretas e a doença em humanos (CASADEVALL e PERFECT, 1998).

Em virtude das praças apresentarem uma grande quantidade de pombos, é de suma importância, verificar a ocorrência de contaminação das fezes destas aves presentes nas praças, por ser um local de lazer, sobretudo para crianças que brincam e alimentam estes animais.

2 *Cryptococcus neoformans*

O *C. neoformans*, foi primeiramente isolado de suco de pêssago por Sanfelice (1894) na Itália. A primeira vez isolada e identificada como patógeno humano, foi no mesmo ano na Alemanha a partir da descrição de um caso de um portador de periosteíte crônica da tíbia, diagnóstico feito pelos médicos Busse e Brusckhe (SIDRIN e ROCHA, 2004).

O gênero *Cryptococcus* é composto de 19 espécies diferentes, sendo que somente o *C. neoformans* cresce a 37°C e é capaz de causar doença no homem. Outras quatro espécies de *Cryptococcus* podem ser encontradas na microbiota da pele, dentre elas estão o *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. terreus* e *C. uniguttulatus*, que raramente podem causar lesões.

O *C. neoformans* é uma levedura encapsulada que causa infecção, sobretudo em indivíduos com função imune comprometida, particularmente em indivíduos infectados pelo HIV. O fungo infecta primariamente os pulmões, e posteriormente outros órgãos como a pele (BIVANCO, 2006). É caracterizado por uma cápsula polissacarídica (Figura 01), que apresenta espessura variável, em ambiente natural a cápsula é fina e pequena, enquanto em tecidos infectados revela-se espessa. A levedura apresenta uma membrana celular cujo principal componente é o ergosterol, ainda apresenta polissacarídeos da cápsula, enzima fenoloxidase e a fosfolipase do *C. neoformans* que em conjunto com a capacidade de crescimento do organismo a 37°C são os maiores fatores de virulência (LACAZ, 2002).

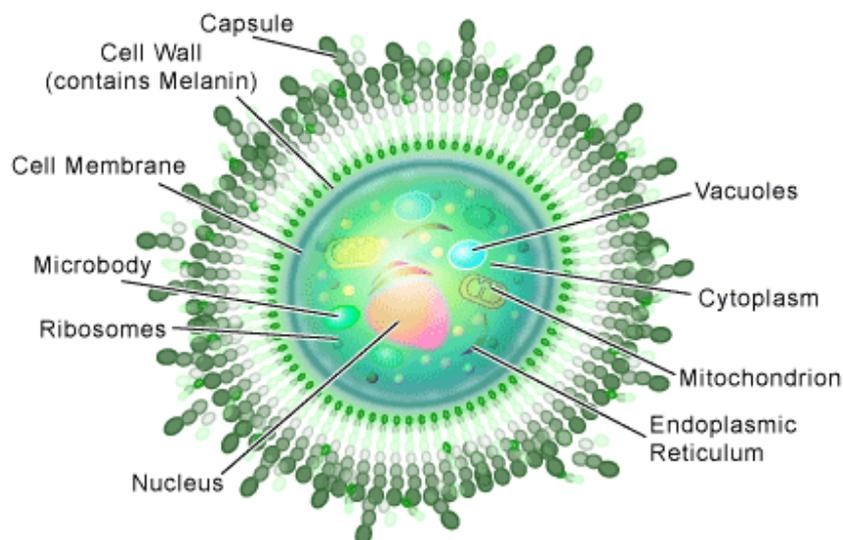


Figura 01: Representação da Cápsula de *C. neoformans*

Fonte: Disponível em: <http://www.gefor.4t.com/hongos/cryptococcusneoformans.html> Acesso em 18 out. de 2011.

O *C. neoformans* apresenta cinco sorotipos (A, B, C, D e AD), sendo subdividido em três variedades: variedade *grubii* (sorotipo A) recentemente descrita, variedade *neoformans* (sorotipos D e AD) e variedade *gattii* (sorotipos B e C) (FRANZOT *et al.*, 1999). O sorotipo A é o mais frequente em infecções humanas, o B isolado certa vez em pacientes provenientes dos Estados Unidos tem sido cada vez menos estudado, o sorotipo C prevalece em áreas tropicais e o sorotipo D é prevalente na Europa.

Para Rosenbaum e Gonçalves (1994), os sorotipos A e D são os que mais comumente causam infecção no homem e 90% delas ocorrem em hospedeiros imunocomprometidos. A distribuição do *C. neoformans* var. *neoformans* é mundial, ao contrário da variedade *gattii*, que é mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais (KWON-CHUNG e BENNEDETT, 1984).

No Brasil, estudos de Lacaz & Rodrigues (1983), mostraram que a maioria (64%) de 25 amostras biológicas analisadas pertencia a variedade *neoformans* com prevalência do sorotipo A, seguido pelo sorotipo B e D. De acordo com Nishikawa *et al.* (2003), o sorotipo A tem-se mostrado prevalente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, tanto em isolados clínicos quanto ambientais, enquanto nas regiões Norte e Nordeste, o sorotipo B predomina em todos os isolados (PAPPALARDO & MELHEM, 2003).

Os estudos imunológicos são pouco sensíveis para verificar a variabilidade entre isolados, sendo que a tipagem molecular se mostra mais discriminatória, fornecendo subsídios para responder a questões relacionadas à epidemiologia, patogênese do fungo, detecção de micro-epidemias, distinção entre re-infecção e infecção primária e caracterização de linhagens resistentes a alguns fármacos (DROMER *et al.*, 1994; MITCHELL e PERFECT, 1995; CASALI *et al.*, 2001, 2003).

Várias técnicas têm sido utilizadas para a tipificação molecular, como DNA amplificado ao acaso, RAPD – (*random amplified polymorphic DNA*), análise de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*), cariotipagem, reação de polimerase em cadeia (PCR - *polymerase chain reaction*), entre outros (LUGARINI, 2007).

Todas essas técnicas têm mostrado grande heterogeneidade genética nos isolados clínicos e ambientais, podendo ser traduzida em variações fenotípicas responsáveis por aumento da virulência e resistência aos agentes terapêuticos (CASALI *et al.*, 2001).

2.1 Ciclo de vida

C. neoformans e *C. gattii* se reproduzem assexuadamente por brotamento, estando a grande maioria dos isolados clínicos e ambientais presentes na forma anamórfica haplóide. Apesar disso, essa levedura pode se reproduzir sexuadamente, correspondendo ao estado perfeito, sendo este estágio denominado de *Filobasidiella neoformans* e *F. bacillispora*, correspondente aos anamorfos *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente (KNOW-CHUNG e BENNETT, 1992; MITCHELL e PERFECT, 1995; SORREL e ELLIS, 1997; BOEKHOUT *et al.*, 2001; CASALI *et al.*, 2001; KNOW-CHUNG *et al.*, 2002; TRILLES *et al.*, 2003).

São mais frequentemente isolados na forma anamórfica haplóide, tanto a partir de isolados clínicos como de amostras ambientais. Entretanto, por ser um basidiomiceto heterotático, pode passar por uma fase dimórfica e se transformar na forma filamentosa, através de dois caminhos distintos: conjugação de células haplóides e a mating type para produzir filamentos dicarióticos, como também de frutificação monocariótica, que produz filamentos e basidiósporos sob condições laboratoriais (LIN e HEITMAN, 2006).

2.2 Macromorfologia

A colônia desenvolve-se com aspecto cremoso, brilhante e úmida de coloração branco-amarelada de início, tornando-se bege escuro a marrom com o tempo (Figura 02). Com a evolução a colônia escorre no tubo de cultura e torna-se escura, o anverso de aspecto mucóide branco, úmido, viscoso e o reverso claro.



Figura 02: Cultura de *Cryptococcus neoformans*
Fonte: NARDELLI *et al.*(2005).

Staib (1962) foi o primeiro pesquisador que utilizando extrato de fezes de aves em meios de cultura, observou que o *C. neoformans* produzia colônias de coloração marrom com produção de melanina que, provavelmente, ocorria devido a presença das sementes de *Guizotia abyssinica* (alpiste) que estas aves utilizavam em sua alimentação (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992)

Em relação às provas bioquímicas, a levedura apresenta reação para urease e inositol positivas, nitrato e de assimilação de lactose, melibiose e da fermentação de carboidratos negativas (ZAITZ, 2004).

O fungo apresenta reprodução sexuada e assexuada no seu ciclo de vida. Em uma semana, o crescimento miceliano é observado a olho nu na margem da colônia. As hifas são hialinas, em largura média é de três μm , os basídeos se desenvolvem na porção terminal ou em ramificação lateral da hifa, são longos, delgados, hialinos e sem septos, com uma dilatação abrupta do ápice, em forma de clava ou subglobosa (SIDRIN e ROCHA, 2004).

O *C. neoformans* é encontrado em todo o mundo, onde quer que os pombos

se aninhem. A levedura é capaz de sobreviver a passagem pelos intestinos das aves e permanecem viáveis por dois anos, ou mais nos excrementos depositados em torno dos ninhos, porém durante muito tempo, as fezes depositadas no solo perdem a cápsula da levedura (FISHER e COOK, 2001).

2.3 Micromorfologia

O *C. neoformans* é uma levedura globosa ou oval, de paredes fina e tamanho variado (FISHER e COOK, 2001).

As células são isoladas ou em pares, capsuladas (Figura 03), com parede grossa, bem espessa, com brotamento (MINAMI, 2003).

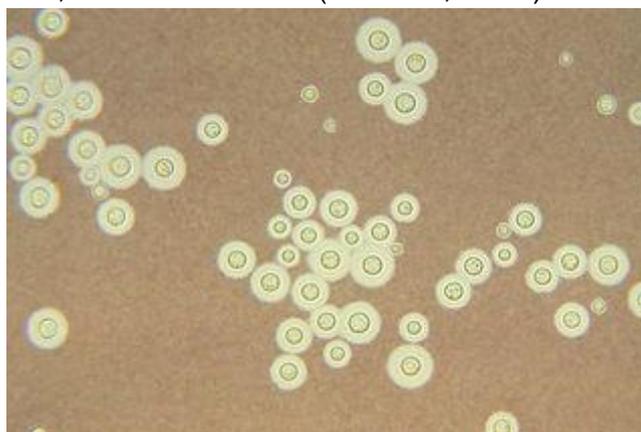


Figura 03: Micromorfologia *Cryptococcus neoformans*

Fonte: Disponível em: <<http://mbioblog.asm.org/mbiosphere/2011/08/spotlight-cryptococcus-neoformans.html>>. Acesso em 10 de ago. de 2011.

3 POMBOS (*Columba livia*)

A distribuição mundial original dos pombos é difícil de determinar pela sua longa história de domesticação. Atualmente a espécie apresenta uma distribuição vasta que inclui todos os continentes com exceção da Antártica. As populações selvagens ocorrem em distribuição mais reduzida, estando praticamente ausentes nas Américas do Sul e Norte, na parte sul de África, Norte da Europa e da Ásia e em toda a Austrália (GIBBS *et al.*, 2001).

As aves alimentam-se principalmente de sementes de cereais, de leguminosas e de plantas selvagens. Também comem folhas e rebentos de plantas e invertebrados, porém devido a alta adaptação urbana, hoje estes columbiformes alimentam-se de lixo e restos alimentares deixadas pela população nas ruas ou ambientes abertos.

O *C. neoformans*, apresenta também, a capacidade de colonizar a mucosa do papo de pombos, sem causar doença, comportando-se como endosaprófitos naturais destas aves. A universalidade e a peculiar adaptação de pombos a centros urbanos relacionam-se com a ubiquidade deste agente fúngico, sendo facilmente isolado de fontes ambientais, inclusive de poeira domiciliar (PASSONI *et al.*, 1998).

O papel dos pombos na disseminação do *C. neoformans* não está totalmente compreendido, apesar das inúmeras pesquisas envolvendo o fungo. As evidências sugerindo as excretas de pombos como fonte de infecção humana são confirmadas pela identificação das mesmas linhagens em amostras fecais de pombos e em isolados de amostras clínicas por métodos de tipagem de DNA (FRANZOT *et al.*, 1997).

4 CRIPTOCOCOSE

A criptococose é uma infecção fúngica causada pela levedura encapsulada que dentre 37 espécies presentes no gênero *Cryptococcus*, a espécie *neoformans* é o principal agente patogênico aos humanos. Na literatura há raros casos causados por outras espécies como *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii* (VICHKOVA-LASHKOSKA *et al.*, 2004).

A infecção por *C. neoformans* é adquirida através da inalação de propágulos de origem ambiental (LEVITZ, 1991), representados por leveduras desidratadas, menores que 2mm de diâmetro, facilmente aerossolizadas.

A doença é caracterizada por um primeiro estágio, onde a infecção fica delimitada ao sistema respiratório, podendo assumir as formas aguda, subaguda ou crônica. Pode, ainda, apresentar-se como uma infecção secundária, resultante da disseminação para o sistema nervoso central, sítio pelo qual a levedura apresenta tropismo, podendo desencadear quadros de meningite, encefalite ou meningoencefalite (CASALI *et al.*, 2001).

Segundo um estudo em pacientes infectados por *C. neoformans*, realizado por Moreira *et al.* (2006), a AIDS apresentou 81,3% dos fatores de risco que mais frequentemente esteve associado à micose, seguido do lúpus eritematoso e das neoplasias.

O fungo quando está na corrente sanguínea pode infectar qualquer órgão, inclusive a próstata. LIMA *et al.* (1997), relata o caso de um paciente imunossuprimido com criptococose confinada à próstata, o qual foi realizado necropsia e ao observar ao microscópico, demonstrou tratar-se de criptococoma caracterizado por abundantes formas fúngicas, tipo leveduriformes.

4.1 Manifestações Clínicas

A criptococose pode se apresentar de forma localizada ou generalizada (ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994; PAPPALARDO e MELHEM, 2003), sendo na maioria das vezes, diagnosticada na forma disseminada (ROZENBAUM e GONÇALVES, 1994).

As características patogênicas do *C. neoformans* são determinadas por três fatores: as defesas do hospedeiro, a virulência do microrganismo e o tamanho do

inóculo. Considerando a grande exposição humana, a natureza do fungo na natureza, pode-se comprovar que o fator defesa do hospedeiro é determinante, já que é baixa a prevalência de infecções sintomáticas.

Na maioria dos casos, o fungo atinge o organismo através da inalação de partículas contaminadas, e raramente pode ocorrer por inoculação direta na pele, causando criptococose cutânea.

As manifestações clínicas geralmente estão relacionadas ao sistema nervoso central, com quadro de meningoencefalite subaguda ou crônica. Os sintomas são febre e cefaléia e mais raramente alteração do nível de consciência (MITCHELL e PERFECT, 1995). Em imunossuprimidos, causa infecção sistêmica ou do sistema nervoso central, a meningite é a forma mais comum de criptococose.

4.1.1 Meningite Criptocócica

O *C. neoformans* é o fungo mais comum que produz infecção do sistema nervoso central, normalmente a infecção ocorre após a inalação do agente (Figura 04). Cerca de 70% dos casos de meningite por *Cryptococcus* sp. afetam o sexo masculino, e a maioria ocorrem em indivíduos de meia-idade. Cerca de 50% estão associados à neoplasia maligna, outras doenças graves ou imunodeficiências. A meningite fúngica produz contagem celular elevada em cerca de 100% dos casos (faixa de 90-97%). Em geral, a contagem é inferior a 300/mm³ e, na maioria dos casos, inferior a 150/mm³. Os níveis de proteínas estão elevados em cerca de 90% dos casos e o nível de glicose do LCR apresenta-se diminuído em 50-75% dos pacientes. A melhor prova diagnóstica rápida é a prova de aglutinação do látex em lâmina para antígeno criptocócico no LCR. Esta prova detecta cerca de 90-95% dos casos. O índice de detecção aumenta ligeiramente quanto tanto o LCR quanto o soro são examinados (RAVEL, 1995).

A capacidade de produzir manitol pelo fungo contribui para a sobrevivência no hospedeiro. Pesquisas têm demonstrado que altas concentrações de manitol no SNC contribuíram para formação de edema cerebral, já que este é um precursor para radicais hidroxila, o que leva a proteção dos microrganismos contra descargas oxidativas e, com isto, aumenta a resistência ao estresse do hospedeiro (BUCHANAN e MURPHY, 1998).

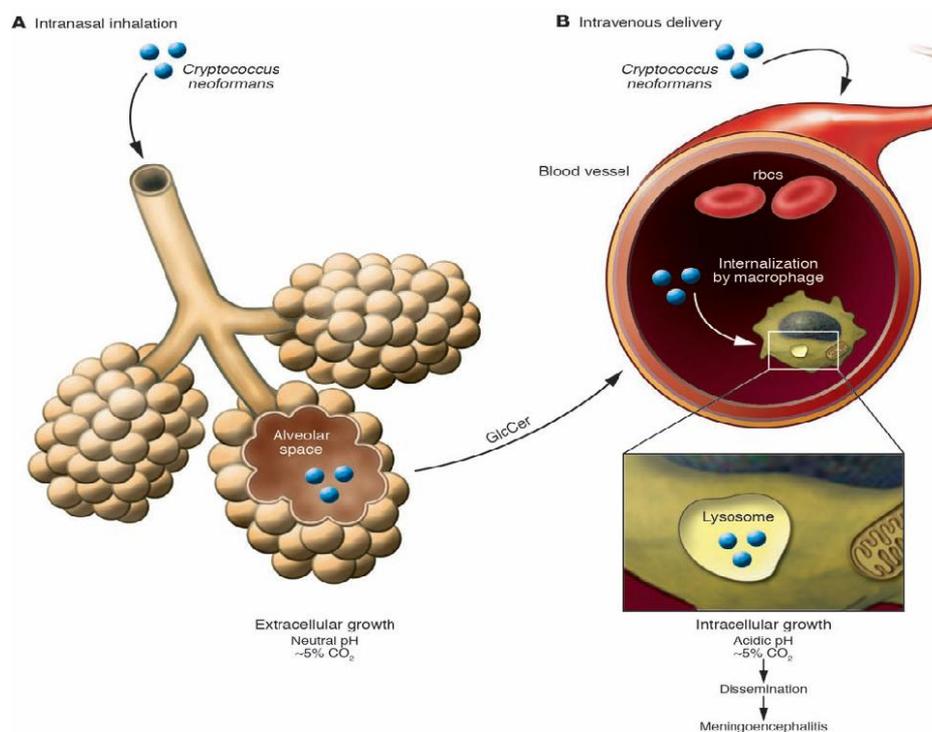


Figura 04 : Ciclo de Transmissão do *C. neoformans*

Fonte: Disponível em: <<http://www.grin.com>>. Acesso em 20 de out. de 2011.

Segundo pesquisa realizada no Hospital Couto Maia na Bahia por Darzé *et al.* (2000), relataram que a cefaléia foi o sintoma mais comum, seguido de febre e rigidez de nuca, também foram observados em alguns pacientes algumas alterações visuais, como diminuição da acuidade visual, turvação de visão, fotofobia e diplopia.

4.1.2 Criptococose Pulmonar

A infecção ocorre por inalação dos esporos do fungo (Figura 05), o hospedeiro desenvolve um complexo linfonodal pulmonar primário. Na maioria dos casos, a inalação de fungo produz uma infecção pulmonar assintomática autolimitada, e as leveduras permanecem latentes dentro desse complexo, morrem ou, com um posterior evento de imunossupressão, são reativadas e causam a doença (SEVERO *et al.*, 2009). A infecção primária pode causar sintomas pulmonares, podendo também se disseminar para outros órgãos, como o cérebro.

O pulmão é o sítio mais comum da criptococose, apresentando diversas manifestações clínicas, que variam de infecção assintomática, presença de nódulo solitário, até pneumonia grave (PERFECT e CASADEVALL, 2002).

Os pacientes que têm criptococose pulmonar aguda podem apresentar febre, tosse produtiva, dor torácica e perda de peso (NADROUS *et al.*, 2003).

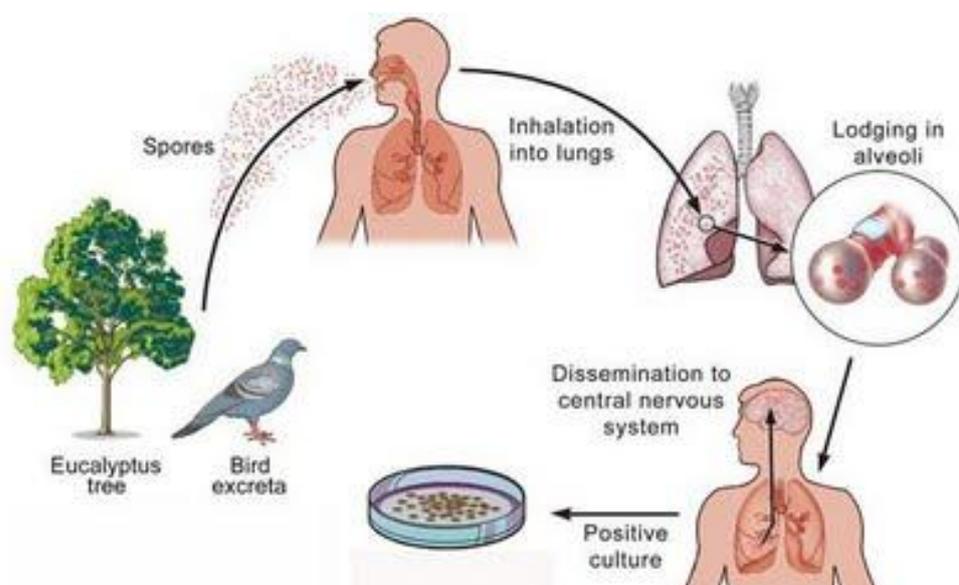


Figura 05 : Ciclo de Transmissão pulmonar do *C. neoformans*

Fonte: Disponível em: <<http://www.grin.com>>. Acesso em 20 de out. de 2011.

4.2 Diagnóstico

O diagnóstico é confirmado através do isolamento do fungo em sangue, líquor, urina, secreções respiratórias, pus ou tecidos de lesões cutâneas, podem ser realizados exames diretos, cultura e sorologia.

4.2.1 Exame Direto

O exame direto das amostras revela as células globosas ou ovais, apresentando o brotamento único ou múltiplo, envoltas pela cápsula, evidenciada quando coradas com tinta da China. As amostras devem ser concentradas por centrifugação ou filtração, aumentando a possibilidade de recuperar qualquer *C. neoformans* presente, preferindo sempre a filtração, pois a centrifugação pode romper as células das leveduras.

4.2.2 Cultura

As amostras clínicas são semeadas em ágar Sabouraud ou em outro meio diferencial como ágar semente de Niger, semente de girassol, ágar dopamina, ágar L-dopa ou ágar batata cenoura (LACAZ, 1991). O *C. neoformans* pode crescer a

temperaturas de 25°C a 37°C durante 7 dias.

4.2.3 Sorologia

As reações imunológicas podem ser realizadas através de reação de aglutinação, de fixação do complemento e de imunofluorescência, bem como a intradermorreação com a criptococina (BIVANCO *et al.*, 2006).

O método ideal para o diagnóstico é a pesquisa do antígeno polissacarídeo circulante no soro é o líquido, podendo ser detectado com partículas de látex sensibilizadas por antiglobulina específica (LACAZ *et al.*, 2002).

4.2.4 Identificação Laboratorial

Testes bioquímicos bem como métodos especiais para exame de morfologia do *C. neoformans* também são valiosos. Os testes incluem utilização de nitratos e carboidratos.

O teste da urease é bastante utilizado, pois a levedura realiza hidrólise da uréia com produção de amônia, que alcaliniza o meio de cultura, causando uma viragem do indicador de pH do neutro para o básico, evidenciando uma coloração rosa intensa.

4.3 Tratamento

O *C. neoformans* apresenta na sua constituição uma espessa parede constituída por quitina e polissacarídeo, ainda uma membrana celular cujo principal componente é o ergosterol. Em razão das características estruturais do fungo eles são naturalmente resistentes aos antimicrobianos utilizados em infecções causadas por bactérias (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

As drogas no combate ao *C. neoformans* mais indicadas são a anfotericina B, que foi o primeiro antifúngico eficaz no tratamento de micoses profundas, e o fluconazol (derivado azólico), que inibe a síntese do ergosterol presente na membrana fúngica.

5 METODOLOGIA

Para a amostragem foram selecionadas seis praças da região central da cidade de Lages (SC). A praça 1 – Parque Jonas Ramos (Figura 05), praça 2 – Praça João Costa (Figura 06), praça 3 – Praça João Ribeiro (Figura 07), praça 4 – Praça Siqueira (Figura 08), praça 5 – Praça Joca Neves (Figura 09) e praça 6 – Calçadão Túlio Fiúza de Carvalho (Figura 10). Foram utilizadas como critérios para a seleção das praças o fluxo de pessoas e maior concentração de pombos.

Foram realizadas medições nas praças com a finalidade de calcular a área e posterior divisão de quadrantes para possibilitar as coletas de material fecal de pombos. Quadrantes de 25m² foram definidos nas praças e as amostras foram colhidas de quatro pontos distintos de cada quadrante, formando uma amostra por quadrante, conforme consta na Tabela 01.

Tabela 01 - Número de quadrantes/amostras por praça.

	Praça	N° Quadrantes/ Amostras
1	Parque Jonas Ramos	5
2	Praça João Costa	8
3	Praça João Ribeiro	6
4	Praça Siqueira	2
5	Praça Joca Neves	3
6	Calçadão Tulio Fiuza de Carvalho	5
	TOTAL DE AMOSTRAS	29

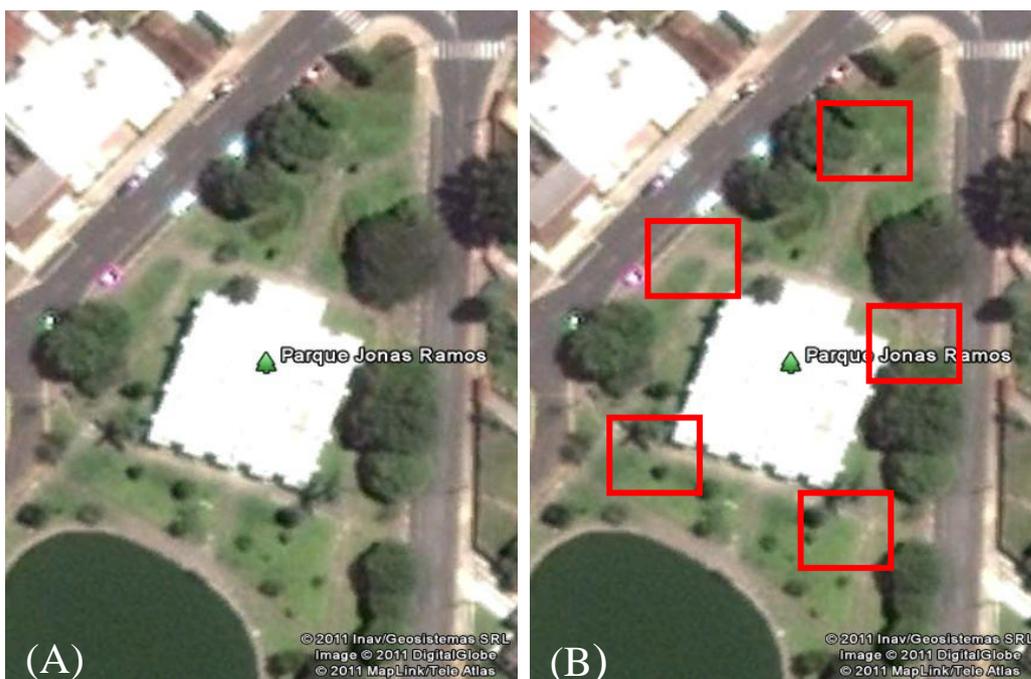


Figura 06: (A) Parque Jonas Ramos(3771,40 m²); (B) Distribuição dos cinco quadrantes
Fonte: Google Earth

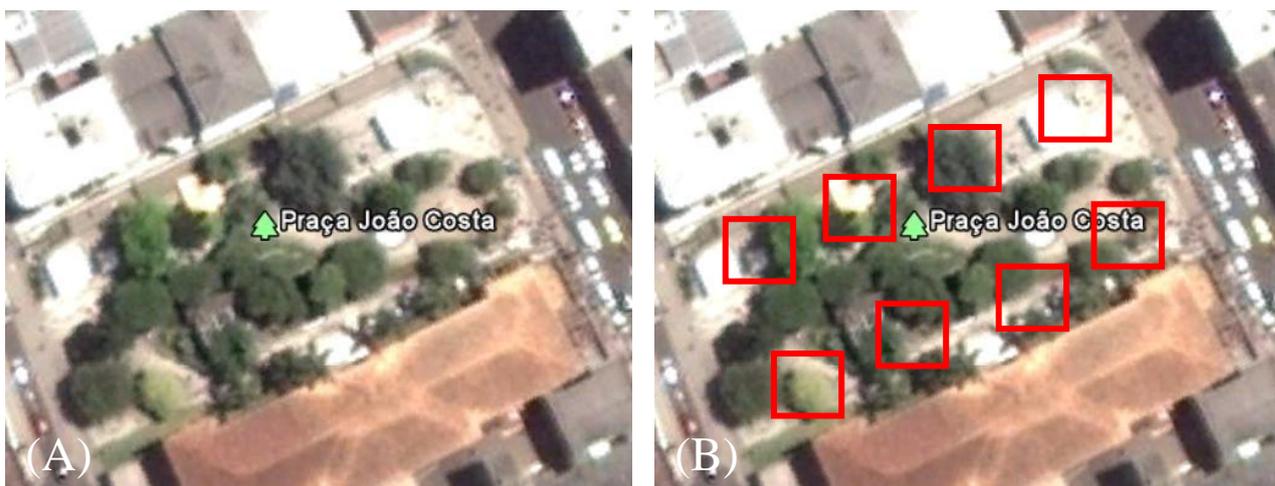


Figura 07: (A) Praça João Costa (3585,96 m²); (B) Distribuição dos oito quadrantes
Fonte: Google Earth



Figura 08: (A) Praça João Ribeiro (2585,24 m²); (B) Distribuição dos seis quadrantes
Fonte: Google Earth



Figura 09: (A) Praça Siqueira (572,76 m²); (B) Distribuição dos dois quadrantes
Fonte: Google Earth



Figura 10: (A) Praça Joca Neves (682,36 m²); (B) Distribuição dos três quadrantes
Fonte: Google Earth



Figura 11: (A) Calçada Túlio Fiúza de Carvalho (1892,92 m²); (B) Distribuição dos cinco quadrantes

Fonte: Google Earth

Com o auxílio de espátulas e luvas, foram colhidas cerca de 5 mg de fezes envelhecidas e secas provenientes dos pombos (Figura 12).

As amostras foram acondicionadas em potes estéreis devidamente identificados, com datas e locais das coletas. Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Cultura e Microbiologia da Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC).

As amostras foram homogeneizadas em gral com pistilo de porcelana previamente esterilizado, suspenso cerca de 1g do material homogeneizado, em 2mL de solução fisiológica estéril e agitadas em vórtex por três minutos, deixando repousar por 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e semeado em meio àgar Sabourand e BHI modificado, adicionado cerca de 4mL de extrato de semente de Níger, com a finalidade de observação da coloração da

colônia que adquire uma coloração marrom devido a atividade fenoxidase em presença de substrato contendo compostos fenólicos. Em ambos os meios, 10 ml de álcool foi utilizado para diluir 100 mg de Cloranfenicol para 1 litro do meio de cultura a fim de impedir crescimento bacteriano. As placas foram incubadas em estufa, por sete dias, a uma temperatura de 29 a 30,5°C. Após as colônias desenvolvidas, com o auxílio de uma alça de platina, as lâminas foram preparadas, coradas com tinta da china e observadas em microscópio óptico em um aumento de 1000X.

Para confirmação, as possíveis colônias de *C. neoformans*, marrons e/ou bege-claro, foram submetidas a prova da urease. Segundo Reolon 2004, o *Cryptococcus* hidrolisa a uréia, por meio de uma metaloenzima, resultando em amônia e carbamato, alterando o pH do meio, e a coloração.

Cada colônia foi inoculada em tubos contendo o meio para realização da prova, alterando a coloração do meio de amarelo para rosa (positivas).

Foram realizadas duas coletas com 28 amostras fecais de pombos de cada praça, totalizando 58 amostras entre os meses de junho e julho de 2011. Para cada praça o procedimento de coletas e análises do material foram os mesmos.



Figura 12: Coleta de fezes de pombos
Foto: SCAIN, 2011.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 58 amostras fecais de pombos analisadas, 39 foram apresentaram morfologia colonial e micromorfologia leveduriforme capsular compatível para o *C. neoformans*, para a confirmação do diagnóstico foi realizado a prova de urease (Figura 13), destas, 25,86% (15 amostras) apresentaram resultados positivos, sendo oito na primeira coleta e sete na segunda, nas demais amostras, não observou-se a morfologia colonial ou microscópica compatível com *C. neoformans*.

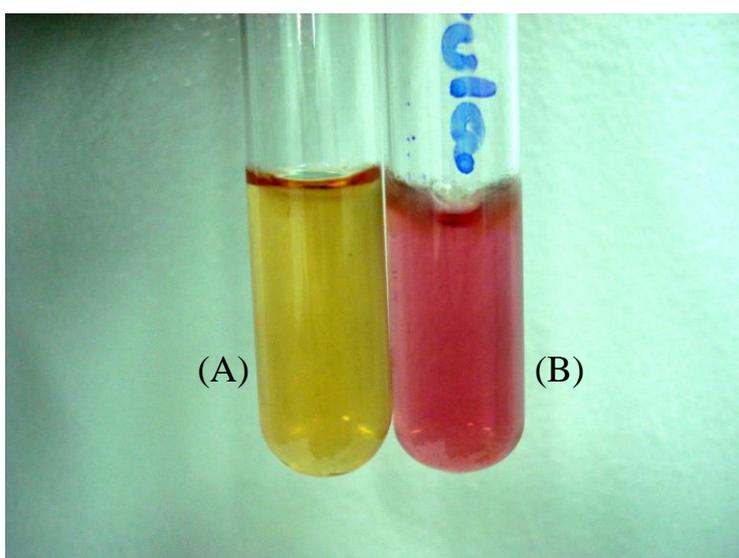


Figura 13: PROVA DA UREASE (A) Urease Negativa; (B) Urease Positiva
Foto: SCAIN, 2011.

A positividade das amostras fecais dos pombos em relação às praças públicas através do diagnóstico da urease demonstrou que em sete amostras foram positivas na praça João Costa, quatro no Calçadão Túlio Fiúza de Carvalho, três na Praça João Ribeiro, uma amostra na praça Jonas Ramos e nenhuma na Praça Siqueira e Joca Neves.

A associação entre *C. neoformans* e algumas espécies de aves, principalmente pombos, tem sido frequentemente relatada, e seus excrementos são considerados o substrato natural mais importante para o fungo (CASADEVALL e PERFECT, 1998). A ocorrência de criptococose em aves é raramente descrita, provavelmente, devido a alta temperatura corpórea das mesmas, em torno de 42°C (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

A porcentagem de amostras positivas nesse estudo (25,86%), foi baixa em relação a outros estudos semelhantes no Brasil. Em Porto Alegre (RS), Reolon *et al.* (2004), encontraram a frequência de 100% de amostras positivas, já no mesmo estado em Pelotas, os resultados foram semelhantes ao deste estudo, onde 26,9% das amostras foram positivas (FARIA, *et al.* 2010). Na cidade de Goiânia, Kobayashi *et al.* (2005), encontraram positividade de 23,2%. Soares *et al.* (2005) obtiveram 13,9% de amostras positivas em Santos e Baroni *et al.* (2006) encontrou no Rio de Janeiro em torres de Igreja, 37,8%, resultado a cima dos outros citados, talvez pelo fato de as excretas ficarem protegidas de condições meteorológicas. Estudos realizados por Kobayashi *et al.* (2005) demonstraram que a presença do fungo em amostras ambientais é maior quando as mesmas encontram-se protegidas das condições meteorológicas.

Garcia (2008) em Florianópolis (SC) descreveu que foi possível isolar o fungo em apenas 10% das amostras, ressaltando que as mesmas foram colhidas na torre da Catedral Metropolitana e torre da Igreja São Francisco.

Segundo Reolon (2004), ainda não foi esclarecido, o motivo da presença do fungo nesses excrementos, uma vez que o mesmo não é isolado do trato intestinal desses pombos.

Na maioria das praças da região Central de Lages, ocorre a limpeza diária do ambiente, impossibilitando o acúmulo de fezes deste animal. A praça João Costa apresentou maior número de amostras positivas, pois entre as praças estudadas é o local onde ocorre maior fluxo de pessoas, aumentando assim a população de pombos, devido as pessoas alimentarem as aves (Figura 14).

Para Levitz (1991), o acúmulo de material fecal favorece o desenvolvimento de *C. neoformans* que assimila a creatinina, ácido úrico, purinas e xantinas presentes nas fezes. A praça também é composta de muitas árvores e prédios, servindo de abrigo para essas aves.

Apesar de, em excretas de pombos, *C. neoformans* possuir a habilidade de assimilar creatinina como fonte de nitrogênio (KNOW-CHUNG, 1991), isolados provenientes de excretas de canários mostram pequena ou quase ausente capacidade de assimilar creatinina. A utilização de ácido úrico e de duas purinas (xantina e guanina), pode funcionar como substituta de nutrientes para o patógeno, sendo que esses componentes estão contidos em proporções diferentes nas

excretas de cada espécie (CASADEVALL e PERFECT, 1998; KIELSTEIN et al., 2000).

O estudo feito por Lugarini, 2007, no Paraná, evidencia pela primeira vez, o isolamento de *C. neoformans* em excretas de Passeriformes e Psittaciformes no estado do Paraná e demonstram a importância das excretas dessas aves como reservatório de *C. neoformans* no ambiente e, conseqüentemente, na epidemiologia da criptococose. Queiroz-Telles *et al.* (1998) realizaram uma tentativa de isolamento de *Cryptococcus* spp. a partir de excretas de aves em Curitiba, entretanto não obtiveram isolados a partir de excretas de Psittaciformes.

As praças Joca Neves, João Ribeiro, Siqueira e calçadão Túlio Fiúza de Carvalho já possuem uma circulação restrita de pessoas, reduzindo a população de pombos e conseqüentemente de suas fezes. Outro fator que pode ter contribuído para o baixo índice de contaminação, são as excretas úmidas, pois sofrem decomposição por bactérias, causando a alcalinização do substrato inibindo o crescimento do *C. neoformans*. Segundo Mitchell e Perfect, (1995), fezes secas e mais antigas são fontes mais prováveis para o isolamento do fungo.



Figura 14: Alimentação de pombos na Praça João Costa, Lages – SC.

Fonte: Site Correio Lageano. Disponível em: <http://www.correiolageano.com.br/htmNoticia.php?id=12944&c=4> Acesso em 14 de out de 2011.

Em relação aos meios de cultura, Casadevall *et al.*, (2001), cita que *C. neoformans* quando cultivado em meios com compostos fenólicos é capaz de

sintetizar a melanina através da enzima lacase (fenoloxidase), associada a sua membrana celular. Todas as amostras possivelmente positivas e comprovadas pela prova da urease foram isoladas da cultura em Agar BHI modificado com extrato de Níger, porém cabe salientar que nem todas as colônias apresentaram coloração marrom escura inicialmente conforme descrição da literatura, porém observou-se com o passar dos dias (15 dias do cultivo) que houve o escurecimento das colônias (Figura 15).

Em São Paulo, Baldasso realizou uma pesquisa sobre a microbiota fúngica de material fecal de pombos, 40% das amostras analisadas foram de *C. neoformans*, 8,2 *Candida* sp. e *Aspergillus* sp., 7% zigomicetos, 2,3% *Tricophyton* sp. e 1,2% *Cryosporium* sp., isso mostra, que a Criptococose pode ser facilmente inalada e ser a causa mais frequente das infecções oportunistas em humanos imunocomprometidos.



Figura 15: Crescimento de diferentes espécies fúngicas em Agar BHI modificado.
(A) Colônias de *C. neoformans*.
Foto: SCAIN, 2011

Todas as leveduras isoladas eram globosas (Figura 16), com cápsula não muito espessa, termotolerantes a 37°C e positivas na prova da urease.

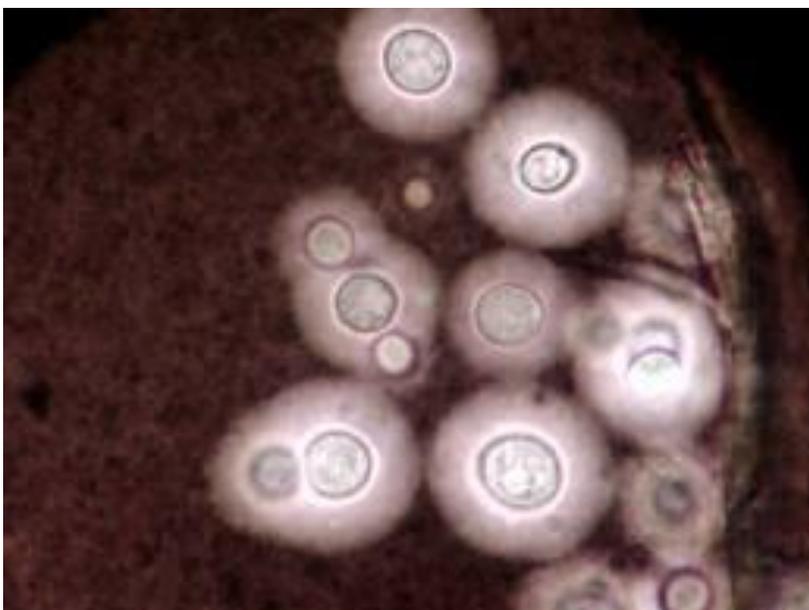


Figura 16: Leveduras de *C. neoformans*

Fonte: Disponível em: <http://www.gefor.4t.com/hongos/cryptococcusneoformans.html>. Acesso em 18 de out. de 2011.

7 CONCLUSÃO

Das 25,86% de positividade para o *C. neoformans* em seis praças públicas amostradas, a praça João Costa foi a que obteve maior número de amostras positivas o que conclui-se, que as praças com maiores concentrações de pombos e fluxo de pessoas são fatores importantes para instalação do fungo no ambiente. A limpeza diária dos ambientes públicos de Lages pode reduzir o acúmulo das excretas, possibilitando que o fungo não se desenvolva, fato que foi observado, sobretudo em praças com limpezas diárias.

Outro fator importante que pode ser atribuído no resultado deste trabalho foi em decorrência do alto índice pluviométrico registrado durante o período de coleta das amostras. Este fator pode ser determinante para a sobrevivência do fungo, uma vez que a umidade é de suma importância na sua manutenção no ambiente, fazendo-se necessário para o isolamento do fungo, a coleta de fezes desidratadas.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram também, que é necessário aumentar o número de amostras, assim como realizar coletas em diferentes estações do ano para a obtenção de maiores informações sobre a epidemiologia do fungo na região urbana de Lages.

8 REFERÊNCIAS

BALDASSO, A. B. *et al.* Potencial zoonótico da microbiota fúngica de excretas de pombos (*Columba livia*) da cidade de Araçatuba, São Paulo. Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_36818163874.pdf>. Acesso em 11 de set. de 2011.

BARONI, F. de A., *et al.* *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, p.71-75, 2006.

BIVANCO, F. C. *et al.* Criptococose cutânea. **Arquivo Médico ABC**, 2006.

BOEKHOUT, T. *et al.* Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v.147, p.891-907, 2001.

BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emer. Infec. Dis.*, Oklahoma, v. 4, n. 1, p. 71-83, 1998.

CASALI, A. K. *et al.* *Cryptococcus neoformans*: Aspectos epidemiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 20, 2001.

CASALI, A.K. *et al.* Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, v.3, p.405-15, 2003.

CASADEVALL, A., *et al.* Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics**. v.107, p.E66, 2001.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press, Library of Congress, 541 pp., 1998.

DARZÉ, C. *et al.* Características Clínicas Laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.33, p.21-26, 2000.

DROMER, F. *et al.* Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype D clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.10, p.2364-71, 1994.

FARIA, R. O. *et al.* Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na Cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43. p. 198-200, 2010.

FISHER, F.; COOK, N. B. **Micologia**: fundamentos e diagnóstico. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

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

FRANZOT, S. P.; SALKIN, L. F.; CASADEVAL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* separate status for *C. neoformans* serotype A isolates. **Journal Clinical Microbiology**. v.37, p.838-840, 1999.

GARCIA, L. C. Estudo genotípico de *Cryptococcus neoformans* isolados de amostras ambientais no Município de Florianópolis, Santa Catarina, 2008. Disponível em: <http://www.cienciasbiologicas.ufsc.br/TCC-BIOLOGIA-UFSC/TCC/LarissaCGarciaBioUFSC-08-2.pdf>. Acesso em 10 de out. de 2011.

GIBBS, D. *et al.* *Pigeons and Doves of the World. A guide to the pigeons and doves of the World*. Pica Press, Sussex, 2001.

GRANADOS, D. P.; CASTAÑEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. **Microbial Ecology**, v.49, p. 282-90, 2005.

KIELSTEIN, P. *et al.* Occurrence of *Cryptococcus* spp. in excreta of pigeons and pet birds. **Mycoses**, v.43, p.7-15, 2000.

KOBAYASHI, C. C. B. A. *et al.* Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, p.203-207, 2005.

KNOW-CHUNG, K.J. The discovery of creatinine assimilation in *Cryptococcus neoformans*, and subsequent work on the characterization of the two varieties of *C. neoformans*. **Zentralblatt fuer Bakteriologie**, v.275, n.3, p.390-3, 1991.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Epidemiology**. v.30, p.120-123, 1984.

_____, Cryptococcosis. **Medical Mycology Philadelphia**, p.397-445, 1992.

_____, Medical Mycology. **Philadelphia**: Lea e Figiber, 1992. 866p.

KNOW-CHUNG, K.J. *et al.* Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v.51, p.804-6, 2002.

LACAZ, C. S. *et al.* **Criptococose**. In: Tratado de Micologia Médica. 9.ed. São Paulo: Savier, 2002.

LACAZ, C. S. *et al.* **Micologia médica**: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8.ed., São Paulo: Sarvier, 1991.

LACAZ, C. S.; RODRIGUES, M. C. Sorotipagem do *Cryptococcus neoformans*. **Revista Brasileira de Medicina**, v.40, p.297-300, 1983.

LEVITZ, S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **Rev Infect Dis**, v.13, p.1163-1169, 1991.

LIMA, M. A. de. *et al.* Infecção por *Cryptococcus* limitada à próstata em paciente aidético com micobacteriose disseminada. Relato de necropsia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.30, p.501-505, 1997.

LIN, X., HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review of Microbiology**, v.8, p.69-105, 2006.

LUGARINI, C. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de passeriformes e psittaciformes no Estado do Paraná, 2007. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/8072/TESE.pdf?sequence=1>
Acesso em 13 de out 2011.

MINAMI, P. S. **Micologia**: métodos laboratoriais de diagnóstico das micoses. 1.ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2003.

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, p. 515-548, 1995.

MOREIRA, T. de A. *et al.* Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.39, p.255-258, 2006.

NADROUS, H. F. *et al.* Pulmonary cryptococcosis in nonimmunocompromised patients. *Chest*.v.124, p.2143-2147, 2003.

NARDELLI, V. *et al.* **Identificación de Aislados de *Cryptococcus neoformans* Usando Agar Staib sin Creatinina**. vol.33, n.2, p.102-108, 2005.

NISHIKAWA, M. M. *et al.* Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolated from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.1, p.73-7, 2003.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.2004.

PASSONI, L. F. C. *et al.* *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Medical Mycology**, v.36. n.5, 1998.

PAPPALARDO, M. C. S. 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.

PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. R.; CLOUD, G. A. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. **Clin Infect Dis**. v.33, p.690, 2001.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v.16, p.837-874, 2002.

QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Tentativa de isolamento de *Cryptococcus neoformans*, a partir de fontes ambientais da região metropolitana de Curitiba, Paraná, Resultados Preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2., 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. p.107.

RAVEL, R. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

REOLON, A. *et al.* Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in urban pigeons of Porto Alegre (RS), Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40., p.293-298, 2004.

Referência Bibliográfica. Disponível em:
<http://www.correiolageano.com.br/htmNoticia.php?id=12944&c=4>. Acesso em 14 de out. 2011.

Referência Bibliográfica. Disponível em
<http://www.gefor.4t.com/hongos/cryptococcusneoformans.html>. Acesso em 18 de out. 2011.

Referência Bibliográfica. Disponível em: <<http://www.grin.com>>. Acesso em 20 de out. de 2011.

Referência Bibliográfica. Disponível em
[http://mbioblog.asm.org/mbiosphere/2011/08/spotlight-cryptococcus neoformans.html](http://mbioblog.asm.org/mbiosphere/2011/08/spotlight-cryptococcus%20neoformans.html)
Acesso em 10 de ago. 2011.

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

SEVERO, C. B. *et al.* Curso de Atualização – Micoses. Criptococose Pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.35, p. 1136-1144, 2009.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SOARES, M. C. B., *et al.* Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, p.31-36, 2005.

SORRELL, T.C.; ELLIS, D.H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.14, p.42-3, 1997.

TRILLES, L. *et al.* Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Medical Mycology**, v.41, p.383-90, 2003.

VICHKOVA-LASHKOSKA M. *et al.* Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in human immunodeficiency virus-negative subject. **European Academy of Dermatology and Venereology JEADV**, 2004.

ZAITS, C. Provas biológicas, nutricionais e bioquímicas mais utilizadas para identificação de dermatófitos e leveduras. In: **Atlas de micologia. Diagnóstico laboratorial das micoses superficiais e profundas**. Rio de Janeiro: Medsi, 2004.