

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

PÓS-GRADUAÇÃO DE MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Cryptococcus neoformans* DE EXCRETAS
DE AVES EM LOJAS DE ANIMAIS DO MUNICÍPIO DE RIO DE JANEIRO**

Juan Rojas Pereira

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DORIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO DE MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Cryptococcus neoformans* DE EXCRETAS
DE AVES EM LOJAS DE ANIMAIS DO MUNICÍPIO DE RIO DE JANEIRO**

JUAN ROJAS PEREIRA

Sob a orientação do Professor
Francisco de Assis Baroni

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Cursode Pós-graduação em Microbiologia Veterinária, Área de Concentração em Microbiologia Veterinária

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

JUAN ROJAS PEREIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências,
no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/03/2006

Francisco de Assis Baroni. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Gisela Costa. Dra. FIOCRUZ

Élcio Rezende Borba. Dr. UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que me apoiaram no desenvolvimento deste projeto, com agradecimento especial ao meu tio, João Telhado que sempre foi um exemplo como profissional e como indivíduo. Aos meus pais e as minhas irmãs que sempre me apoiaram em todos os momentos. A toda a minha família que sempre me incentivou. A minha namorada Catita e a todos os meus amigos. Ao meu orientador e grande amigo Francisco de Assis Baroni por me permitir compartilhar de seus conhecimentos e da sua amizade.

OBRIGADO !!!

BIOGRAFIA

Juan Rojas Pereira nascido no Rio de Janeiro-Rj, Brasil, no dia 23 de julho de 1981, filho de Judith Emilia Roman Rojas e Rui Telhado Pereira. Coursou o 1º grau na Escola Municipal Maria Isabel Bivar (Pilares-RJ), o ensino médio no Colégio Visconde de Caíru (Meier-RJ) e Coursou a graduação em Medicina Veterinária na Universidade Estácio de Sá até o 4º período, indo concluir a sua formação na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Formando-se em março de 2004. Durante o curso foi Monitor de Histologia e Bolsista de iniciação científica da FAPERJ por dois anos (2002 a 2003), desenvolvendo um projeto de micologia junto ao departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do Instituto de Veterinária da UFRRJ, sob a orientação do Professor Francisco de Assis Baroni.

RESUMO

PEREIRA, J.R. **Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* de excretas de aves colhidas em lojas de animais do município do Rio de Janeiro – RJ.** Seropédica UFRRJ: 2006. 57 p. (Dissertação, Mestrado em Veterinária, Microbiologia)

O objetivo do presente trabalho foi verificar o isolamento de *Cryptococcus neoformans* em excretas de aves comercializadas em “pet-shops” localizados no Município do Rio de Janeiro – RJ, realizar a sorogrupagem bioquímica e avaliar a virulência “in vitro”. Foram colhidas 1268 amostras de diversas aves em 25 estabelecimentos distribuídos em 16 bairros do referido município. A sorogrupagem bioquímica foi realizada em meio CGB, enquanto a determinação da produção de protease e de fosfolipase como fatores de virulência, foi realizada “in vitro” pelo emprego de meios específicos contendo respectivamente soroalbumina bovina e gema de ovo. Do total de amostras aviárias coletadas, 85 (6,70%) mostraram-se positivas. A positividade foi verificada isoladamente para as aves, sendo que as excretas de *Melopsittacus undulatus*, *Serinus canaria* e outras aves de maior procura destacaram-se pelo maior número de isolados. A sorogrupagem realizada para 56 cepas revelou que 54 amostras pertencem ao sorogrupo AD (*Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans*) e duas, possivelmente ao sorogrupo BC (*C. neoformans* var *gattii*). Todas as cepas mostraram-se produtoras de protease e de fosfolipase e a maioria revelou-se forte produtora destas enzimas. Dos 56 isolados todos se encaixaram nos biótipos “Killer” I e II (var *neoformans*). A presença deste agente em tais estabelecimentos comerciais deve ser motivo de preocupação para as autoridades sanitárias, considerando-se a possibilidade de infecção para o homem e para outros animais ali comercializados.

Palavras-chave : *Cryptococcus neoformans*, protease, fosfolipase, aves

ABSTRACT

PEREIRA, Juan Rojas. **Isolating and characterization of *Cryptococcus neoformans* from birds droppings collected at petshops in Rio de Janeiro Borough-RJ**. Seropédica: UFRRJ, 2006. 57 p. (Dissertation, Master Science in Veterinary, Microbiology).

The aim of this work was to verify the isolation of *Cryptococcus neoformans* from bird droppings at some petshops trading in Rio de Janeiro borough-RJ, as well as to perform biochemical serogruping and to evaluate the virulence “in vitro”. 1268 samples from several birds at 25 commercial establishments distributed on 16 neighbourhoods in Rio de Janeiro Borough-RJ were collected. The biochemical serogruping was carried out in CGB culture medium plates while protease and phospholipase production indicating virulence factors through specific media containing bovine soralbumin and yolk were performed “in vitro” respectively. Both virulence and serogruping assays for 64 strains were carried out. From the total of samples, 85 (6,7%) were considered positive. Positivity feature was verified for birds, as well as *Melopsittacus undulatus* birds droppings, *Serinus canaria* and other sort of birds showed a greater member of seedlings. According to serogruping, from the total of 56 samples, 54 were classified as serogruping AD (*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*) and just two of them to serogruping BC (*Cryptococcus neoformans* var. *gattii*) possibly. All the strains showed to be protease and phospholipase producers and most as hard ones. Of the isolated 56 all were fit in the biotypes "Killer" I and II (var. *neoformans*). Talking into account the possibility of high level infection for human and animal helth, the presence of this ethiological agent on such kind of establishments, it might be a great concern to sanitary surveillance policy for controllling the infection, furthermore.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, protease, phospholipase, birds.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Histórico	2
2.2. Taxonomia	2
2.3. Micologia	3
2.4. Ecologia	3
2.4.1. Isolamento de ambientes e excretas animais	3
2.4.2. Isolamento de ambientes e vegetais	5
2.4.3. Fenômeno “Killer”	7
2.5. Epidemiologia	7
2.6. Patogenia	9
2.6.1. No Homem	9
2.6.2. Nos animais	9
2.7. Fatores de Virulência	10
2.7.1. Cápsula	10
2.7.2. Manitol e Inositol	11
2.7.3. Aderência	11
2.7.4. Melanina	11
2.7.5. Urease	11
2.7.6. Fosfolipase	11
2.7.7. Proteinase	12
2.8. Métodos de Tipagem	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Escolha das lojas de animais	15
3.2 Amostragem em lojas selecionadas	15
3.3 Processamento das amostras	15
3.4 Leitura dos isolados	16
3.5 Identificação de <i>C. neoformans</i>	17
3.6. Sorogrupagem em meio CGB	18
3.7. Determinação da Virulência	18
3.7.1. Produção de Fosfolipase	18
3.7.2. Produção de Proteinase	19
3.8. Biotipagem por toxinas “Killer”	19
3.9. Preservação das amostras	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS	50
ANEXO 1 – Ofício do Laboratório de Leveduras da UFRRJ	51
ANEXO 2 – Meio Dopamina	52
ANEXO 3 – Meio Christensen	53
ANEXO 4 – Meio CGB	54
ANEXO 5 - Meio ágar fosfolipase	55
ANEXO 6 - Meio para proteinase	56
ANEXO 7 - Meio YEPD modificado	57

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Cryptococcus neoformans* DE EXCRETAS DE AVES EM LOJAS DE ANIMAIS DO MUNICÍPIO DE RIO DE JANEIRO

1. INTRODUÇÃO

A levedura *Cryptococcus neoformans*, ubiqüitária e de vida livre é considerada patologicamente oportunista para o homem e para os animais (Sorrel & Ellis, 1997; Casadevall & Perfect, 1998; Baroni, 2001; Rosário, 2005). Classificada atualmente pela sua forma anamorfa como *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* e *C. neoformans* variedade *gattii*. (Kurtzman & Fell, 1998).

As variedades *neoformans*, correspondem os sorotipos A e D, enquanto que às variedades *bacillispora* e *gattii*, correspondem os sorotipos B e C (Kurtzman & Fell, 1998). Franzot et al (1999) propuseram limitar a variedade *neoformans* apenas ao sorotipo D, enquanto o sorotipo A passaria a pertencer a uma nova variedade, denominada *grubii*. Esta proposição foi baseada em caracteres genotípicos de padrões de polimorfismo de DNA. Para efeitos de estudo, considera-se a nomenclatura do estado anamorfo.

É sabido que esta levedura é oportunista, acometendo a todos que apresentam queda de imunidade, como os portadores de HIV, portadores de diabetes, portadores de doenças malignas ou sob tratamento corticoterápico. Também entre os animais, a criptococose ocorre principalmente entre aqueles que apresentam algum tipo de comprometimento imunológico (Ferrer et al, 1992; Mancianti et al, 1992; Ramos-Vara et al, 1994), ou com defeitos congênitos (Faggi et al, 1993).

A cidade do Rio de Janeiro é uma cidade que apresenta, junto ao seu comércio, inúmeras lojas que trabalham com pássaros domésticos e outras aves. As instalações são majoritariamente precárias e desaconselháveis ao comércio de animais, com acúmulo de excretas, que resultam na proliferação de vários microorganismos, incluindo o *Cryptococcus neoformans*, com risco de disseminação aos freqüentadores. Estas circunstâncias podem, também, possibilitar o desenvolvimento de casos de infecção através das vias respiratórias para o homem, além da infecção de outros animais como cães e gatos, geralmente também presentes para comercialização.

Este trabalho objetivou determinar o grau de isolamentos de *C. neoformans* em “pet shops” do Município do Rio de Janeiro. Um maior entendimento deste aspecto ecológico do agente *Cryptococcus neoformans* poderá evitar o desenvolvimento da patologia nos casos de indivíduos imunocomprometidos, além de propiciar um melhor entendimento dos casos de infecção nos mesmos e também nos animais domésticos. Outro objetivo foi a sorogrupagem, importante por fornecer dados para que, em estudos futuros, possa-se comparar a patogenicidade de cepas ambientais e de casos clínicos e subclínicos. Em parte, podemos esclarecer quais as possíveis fontes de contaminação para o homem e para os animais em ambiente urbano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Histórico:

Há mais de cem anos uma levedura foi isolada de suco de pêsego por Francesco Sanfelice (1895), apud Mitchell & Perfect (1995), membro do Instituto de Pesquisa da Universidade de Caligari. Este pesquisador observou que a levedura isolada era patogênica, por meio de testes em cães, galinhas e em porquinhos da Índia, sendo que nesses últimos, por inoculação intraperitoneal ocorrendo o desenvolvimento de lesões semelhantes a sarcomas e também com linfadenopatias. O microorganismo foi denominado *Saccharomyces neoformans* em 1895 (Sanfelice, 1895, apud Drouhet, 1997).

Na Alemanha, Otto Busse (1894), apud Mitchell & Perfect (1995), observou uma levedura capsulada, isolada da tibia de um homem de 31 anos, sendo denominada de *Saccharomyces hominis*. No mesmo ano Buschke, apud Drouhet (1997), dermatologista e cirurgião de Berlim estudando o caso avaliado por Otto Busse (1894) verificou por meio da Histopatologia tratar-se de uma lesão causada por um coccídeo.

Ferdinand Curtis (1896), apud Drouhet (1997), verificou um segundo caso de criptococose com lesão no tecido subcutâneo. Na ocasião denominou-a de *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*.

Jean Paul Vuillemin (1901), apud Drouhet (1997), denominou os isolados de Otto Busse e de Curtis, de *Cryptococcus hominis* e o isolado de Sanfelice de *Cryptococcus neoformans*, já que os isolados não eram fermentativos e não formavam ascósporos, diferentemente dos membros do gênero *Saccharomyces*. Este gênero foi criado por Kutzing (1833), apud Drouhet, (1997), para designar leveduras não produtoras de ascósporos.

Observando que os tecidos parasitados eram circundados por áreas claras Stoddard & Cutler (1916), apud Casadevall & Perfect (1998), confundindo a cápsula com área de lise celular renomearam a levedura como *Torula histolytica*. Freeman (1931), apud Casadevall & Perfect, (1998), estabeleceu que os espaços observados correspondiam às áreas de contração sofrida pela cápsula durante a fixação tecidual.

Um estudo que incluiu os isolados de Busse, Curtis e Sanfelice, classificou-as em grupos, identificados pela fermentação, pela assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas, morfologia colonial e sorologia. Este foi desenvolvido por Rhoda Benham (1935), apud Drouhet (1997). A autora, então concluiu que todos os isolados humanos pertenciam à mesma espécie, *Cryptococcus neoformans*. No entanto a autora denominou-a de *Cryptococcus hominis*. Como Sanfelice propusera o nome da espécie em 1895 (*Saccharomyces neoformans*) e que o gênero *Cryptococcus* fora proposto por Kutzing (1833), apud Drouhet (1997), Fell et al (1989) determinaram a denominação *Cryptococcus neoformans* como espécie tipo dos isolados estudados.

2.2 – Taxonomia (Casadevall & Perfect, 1998):

Cryptococcus neoformans é taxonomicamente classificada, na atualidade segundo sua forma de reprodução sexuada como:

Reino: Fungi

Filo: Basidiomycota

Ordem: Filobasidiales

Família: Filobasidiaceae

Gênero: *Filobasidiella*

Espécie:

Filobasidiella neoformans variedade *neoformans* (sorotipo A e D)

Filobasidiella neoformans var *bacillispora* (sorotipos B e C)

Correspondentes anamorfos respectivos:

Cryptococcus neoformans var *neoformans* (A e D)

Cryptococcus neoformans var *gattii* (B e C)

2.3 – Micologia:

Existem mais 34 espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus* além de *Cryptococcus neoformans*, todas consideradas não fermentadoras, assimiladoras de inositol, produtoras de urease e reativas ao azul de diazônio B (Kurtzman & Fell, 1998). Estas outras espécies não estão alocadas no gênero *Filobasidiella*. Elas constam do gênero *Cryptococcus* (Kurtzman & Fell, 1998), apresentando uma grande variedade habitat, sendo, verificadas em diversas partes do mundo, em locais de baixas temperaturas, de elevadas altitudes e em águas salinas (Casadevall & Perfect, 1998).

Dentre estas espécies de *Cryptococcus*, a maioria não resiste aos processos imunológicos e às temperaturas corporais dos mamíferos. A exceção dá-se justamente para *Cryptococcus neoformans*, que está relacionada a quadros infecciosos em humanos e animais. Há poucos relatos de *Cryptococcus laurentii*, *C. curvatus* e *C. albidus* infectando humanos, e quase sempre sem comprovação histopatológica (Gluck et al, 1987 ; Dromer et al, 1995).

Em meio de cultivo sólido, *C. neoformans* apresentam, na reprodução assexuada, um crescimento de coloração creme e aspecto mucóide. As células são globosas ou ovaladas e apresentam uma cápsula de polissacarídeos, sendo o grau do encapsulamento variável de acordo com a cepa e com condições de cultivo (Kurtzman & Fell, 1998).

A descoberta do estágio sexual por Shadomy & Utz (1966) ocorreu quando perceberam que algumas cepas de *Cryptococcus neoformans* produziam hifas com conexões na forma de grampo, similares ao grupo dos basidiomicetos. O gênero proposto por Kwon-Chung (1975), foi *Filobasidiella* e em 1976 mostrou que existiam duas variedades de *Filobasidiella neoformans*. Essa forma de reprodução, teleomórfica produz basidiosporos.

No estado anamorfo a variedade *neoformans* e a *gattii* são semelhantes, mas no teleomorfo diferem fenotipicamente na forma de seus basidiosporos, sendo esféricos ou cilíndricos com paredes rugosas e baciliformes e com parede lisa respectivamente (Kreger van Rij, 1984; Ellis & Howard, 1992).

Evans (1949), apud Casadevall & Perfect (1998), identificou três sorotipos denominados A, B e C. O quarto sorotipo conhecido foi adicionado por Wilson et al (1968), denominado de sorotipo D. A variedade *gattii* de *Cryptococcus neoformans* foi isolada no Zaire, em 1966, a partir de um caso de meningite infantil (Gatti & Feckels, 1970).

Franzot et al (1999), propuseram limitar a denominação de *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* apenas aos isolados pertencentes ao sorotipo D, sendo o sorotipo A denominado variedade *grubii*. Para tal, basearam-se em caracteres genotípicos de padrões de polimorfismo de DNA.

2.4 – Ecologia:

2.4.1 – Isolamentos de ambientes e excretas animais:

Por ser uma levedura de distribuição mundial, *Cryptococcus neoformans*, já foi isolada em diversas regiões: na África, Caribe, Ilhas do Pacífico (Ajello, 1956, apud Casadevall & Perfect, 1998 ; Refal et al, 1983; Rosário et al, 2005), na Ásia (HSU et al, 1994

; Padhye et al, 1993), especificamente na China (Li et al, 1993) e no Japão (Toyasaki, 1994), na Europa (Mishra et al, 1981 ; Swinne-Desgain, 1975), América do Norte (Kozel & Hermerath, 1984 ; Powell et al, 1972) e América do Sul (Ruiz et al, 1982 ; Lazera et al, 1993; Passoni et al, 1998; Nishikawa et al, 2003; Abegg et al, 2006, Baroni et al, 2006).

Atualmente entre as fontes mais conhecidas de isolamentos de *Cryptococcus neoformans*, temos as excretas aviárias, principalmente as de pombos urbanos (Swinne-Desgain, 1975; Ellis & Pfeiffer, 1990; Levitz, 1991 ; Passoni, 1998) e de solos contaminados (Ajello, 1958, apud Casadevall & Perfect, 1998).

Nas excretas de pombos e de muitas outras aves existe creatinina, o ácido úrico, as purinas e as xantinas, que são facilmente assimiladas por esta levedura (Levitz, 1991). Nestas excretas dessecadas, *C. neoformans* conserva a viabilidade por quase dois anos e pode crescer a densidades de 30 a 60 milhões de organismos por mL (Litman & Borok, 1968), permanecendo com cápsulas pequenas, porém compatíveis com a deposição alveolar (Levitz, 1991).

Em diversos ambientes urbanos associados ao acúmulo de excretas de pombos, como as torres de igrejas, já foram isoladas amostras de *C. neoformans*. Hubaleck (1975), estudou a distribuição de *C. neoformans* em torres de igreja, evidenciando uma correlação positiva com o conteúdo de ácido úrico e creatinina nas excretas. No Brasil, Baroni (2001) e Baroni et al (2006), realizaram um levantamento da ocorrência de *C. neoformans* em torres de igreja, na cidade do Rio de Janeiro. A presença da levedura foi demonstrada em 100% das igrejas e em 38% do total de amostras de excretas coletadas (além de ovos, penas, ninho de pombos e solo). Em Manaus, também de excretas de pombos, em torre de igreja, Baroni et al (2004) isolaram *C. neoformans*.

Diversos estudos sobre a origem da levedura nas excretas aviárias, demonstraram o seu isolamento de muitas fontes associadas a elas. Swinne-Desgain (1975), isolou *C. neoformans* de água de bebedouros de pombos, de gaiolas de onde as excretas eram positivas ou negativas e de amostras do ar. Em 1976, o mesmo autor buscando esclarecer melhor esta origem, demonstrou que muitos pombos carregam o agente no Inglúvio, mas não no baixo trato intestinal. Para testar a viabilidade da levedura no trato gastrointestinal, forneceu células de *Cryptococcus neoformans* a pombos, que permaneceram viáveis no Inglúvio por até 86 dias (Swinne-Desgain, 1976).

Estudos sobre *C. neoformans* relacionados com os pombos mostram que a levedura raramente lhes causa infecção, presumivelmente pela alta temperatura destas aves (40°C – 42°C) (Ensley et al, 1979 ; Casadevall & Perfect, 1998). Mesmo raros, alguns relatos de criptococose já foram observados na Austrália (Malik et al, 2003) e no Brasil (Raso et al, 2004).

Swinne et al (1986), além de isolarem *C. neoformans* em excretas de pombos e frangos, também isolaram da poeira e ar de casas de pacientes com AIDS e de pessoas saudias.

O isolamento da poeira domiciliar de portadores ou não de HIV e de ambientes freqüentados por pacientes com criptococose e é muito freqüente (Swinne-Desgain et al, 1991; Machado et al, 1993; Passoni et al, 1998).

No Brasil, o sorotipo A, variedade *grubii*, é o mais freqüentemente isolado de excretas de pombos, seguido pelo sorotipo B, variedade *gattii* (Nishikawa et al, 2003). Macedo et al (2004) isolaram sorotipo A de excretas de pombos localizadas em uma escola municipal do Rio de Janeiro. Kobayashi et al (2005) também isolaram a variedade *grubii* de mais de 20% de 171 amostras de excretas de pombos coletadas na cidade de Goiânia, Goiás Brasil.

Excretas de canário como fontes de *C. neoformans* foram citadas por Swinne-Desgain (1975) e por Levitz (1991). Criseo et al (1995), verificaram 29,6% e 22,2% de positividade, respectivamente, para excretas de canários, obtidas de lojas de animais e em residências de Messina e da Calábria, Itália.

Excretas de papagaios como reservatórios de *Cryptococcus neoformans* foram mencionadas por Bawens et al (1986) e por Lopes-Martinez & Castanon-Olivares (1995).

Excretas de outras aves, também constam na literatura, como as excretas de frangos e pardais (Swinne-Desgain et al, 1986) e fezes de faisão (*Agguslanus argus*) (Charkraborty et al, 1991). Irokanulo et al (1997) mencionam o isolamento de excretas do pato de cara branca (*Dendrocygna viduta*), da águia africana do rio (*Cancuna vocifer clamus*) e da águia pintada (*Bubo africanus cinerascene*). Bawens et al (1986), pesquisaram amostras de 261 viveiros do zoológico de Antuérpia, recuperando *C. neoformans* de 13 amostras, sendo sete de viveiros de papagaios.

Pal (1989), isolou *C. neoformans* de excretas, madeiras das gaiolas, ninhos e a partir dos bicos, penas e pés das aves, trabalhando em viveiros de passeriformes, bengali-vermelho (*Amandava amandava*), bico de lacre (*Estrilda formosa*), capuchinho (*Lonchura malacca*) e *Melophus lathami*.

Yasin et al (1991), avaliaram amostras do Zoológico Nacional de Kuala Lumpur e isolaram *Cryptococcus neoformans* das excretas de calau bicórnio (*Buceros bicornis*) e *Anthorrhinnus galeritus*.

Charkraborty et al (1991), isolaram o agente de outras aves como o pato de Moscou (*Cairina moschata*), faisão (*Agguslanus argus*), arara caniné (*Ara arana*) e um papagaio (*Psittacula krameri*), todas apresentando doença de curso prolongado.

Passoni et al (1998), isolaram em ambientes domésticos na cidade do Rio de Janeiro, *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo A) de *Paroaria dominicana*, psitacídeo, *Serinus canarius* (canário belga), *Sicalis flaveola* (canário da terra) e *Sporophila caerulencens* (coleiro).

Filiú et al (2002), analisaram 20 amostras de excretas de aves em ambientes domiciliares e públicos, em Campo Grande, Mato Grosso de Sul. Isolaram, em 10 % das amostras de aves, *C. neoformans* sorotipo A, tendo como positivas as excretas de periquitos australianos, agapornis, calopsita, pombo burguesinho e pombo rabo de leque.

Abegg et al (2006), realizaram um estudo nas excretas de aves do Zoológico de Sapucaia do sul, Rio Grande do Sul, Brasil. Das diversas amostras coletadas 38 foram positivas para *C. neoformans*, destas apenas 5 da variedade *gattii*. Os isolamentos da variedade *grubii* foram realizados a partir de excretas de *Aratinga leucophthalmus*, *Pionus maximiliani*, *Nymphicus hollandicus*, *Psittacula eupatria*, *Nandayus nenday*, *Aratinga janday* e *Amazona rhodocorita*. Nas espécies *Amazona aurea* e *Amazona farinosa* foram isolados dois sorotipos o A (variedade *grubii*) e o B (variedade *gattii*).

Swinne & Eyckmans (1984), isolaram pela primeira vez *C. neoformans* do conteúdo digestivo de baratas (*Periplaneta americana*), no Zaire, feito novamente relatado por Swinne et al (1986).

2.4.2 - Isolamento de ambientes e vegetais:

Nas últimas décadas a variedade *gattii* de *C. neoformans* vem sendo associada a ambientes relacionados a *Eucalyptus sp.* e a outros diversos gêneros vegetais. No Brasil, Lazera et al (1995), isolaram *C. neoformans* de ocos de árvores da espécie *Cassia grandis*. Lazera et al (1998), também relataram o isolamento da levedura a partir de madeira de *Ficus sp.*, *Cassia grandis*, *Mangifera indica* e *Moquilea tomentosa* em Teresina, PI. A variedade *gattii* foi isolada *M. tomentosa*. Os autores sugeriram tratar-se de colonização do microambiente dos ocos das árvores.

Na Austrália, Ellis & Pfeiffer (1990), analisando o ar, o solo e a vegetação, identificaram o primeiro habitat natural de *C. neoformans* variedade *gattii*, associando-o com *Eucalyptus camaldulensis*, relacionando-o com a distribuição da criptococose causada pela

variedade *gattii*. Isolamentos também foram realizados nas reservas de “Barossa Valley” e de “Nuriootpa”, com posteriores isolamentos em “Balranald” e “Hay”, a partir de debris coletados sob as árvores. Houve associação do seu aparecimento com os períodos de floração dos eucaliptos.

Pfeiffer & Ellis (1992), relataram a associação de *C. neoformans* variedade *gattii*, sorotipo B com *Eucalyptus tereticornis* na Costa do Ouro, Queensland, referindo-se a isolamento feito em 1991. *E. tereticornis* e *E. camaldulensis* são espécies taxonomicamente de difícil distinção e com distribuição global similar.

A variedade *neoformans* ocasionalmente pode ser isolada de eucalipto como o fez Duarte et al (1994), na cidade de Bogotá. Os relatos ligando a variedade *neoformans* a árvores, a conhecida associação com a variedade *gattii* e, relação genética estrita entre as variedades, de acordo com Casadevall & Perfect (1998), sugerem que a variedade *neoformans* também pode ter um nicho arbóreo.

Ellis & Pfeiffer (1990), sugerem que mesmo a variedade *neoformans* tem como habitat natural plantas específicas, como cereais, que especialmente os pombos utilizariam como alimentos. Haveria um mecanismo de dispersão sazonal do teleomórfico *Filobasidiella neoformans* var *neoformans*.

Montenegro & Paula (2000), isolaram a variedade *neoformans* em 21% dos parques municipais pesquisados na cidade de São Paulo, trabalhando com excretas de pombos e materiais de eucalipto e, em duas ocasiões isolaram a variedade *gattii*, no parque do Ibirapuera, onde havia *Eucalyptus tereticornis*.

O isolamento de *C. neoformans* do solo é bastante freqüente e segue relacionado com a contaminação por excretas de aves e, em baixos índices (Ajello, 1958, apud Drouhet, 1997). No entanto, para Casadevall & Perfect (1998), não há esclarecimento se os isolados do solo originam-se do solo ou se são um reflexo da contaminação com excretos aviários positivos.

A variedade *gattii* de *C. neoformans* é a mais isolada em ambientes envolvendo vegetações. No entanto existem relatos de isolamentos da variedade *grubii* (sorotipo A), como foi demonstrado por Ergin et al (2004), isolando a variedade *grubii* de *Eucalyptus camaldulensis* na Turquia (uma amostra positiva dentre 1175 coletadas). No Brasil, Kobayashi et al (2005), isolaram também a variedade *grubii* de *Eucalyptus* sp. em Goiás, Goiânia, 14,28 % de 35 amostras avaliadas.

Autores afirmam que células de *C. neoformans* no solo ou em plantas em decomposição, expostas ao tempo, são eliminadas pela luz solar (Ishaq et al, 1968 ; Ellis & Pfeiffer, em 1990). Outros fatores ambientais que podem interferir na ecologia de *C. neoformans*, como foram observados por Neilson et al (1978), que estudaram o trato gastrointestinal de camundongos como modelo de porta de entrada para *C. neoformans*. Neste, observaram amebas de vida livre (*Acanthamoeba polyphaga*) fagocitando células de *C. neoformans*.

Além de fatores relacionados à ação de protozoários, bactérias também foram relatadas inibindo *Cryptococcus neoformans*. Ruiz et al (1982), verificaram várias bactérias com atividade anticriptocócica, isoladas de fezes de pombos. *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e outras da microbiota intestinal de pombos (*Escherichia coli*) influenciam na persistência de *C. neoformans*, na sua reprodução, na morfologia e distribuição na natureza. O mesmo autor relata que em um cultivo de *C. neoformans* com *Acanthamoeba palestinensis*, após quatro dias, resultou em aumento moderado do número de leveduras, com marcada diminuição nos dias posteriores de cultivo.

2.4.3 – Fenômeno “Killer”:

Uma das características de *Cryptococcus neoformans* é a produção de micocinas ou toxinas “Killer”. Tais substâncias, produzidas por alguns fungos podem controlar o crescimento de outros, um fenômeno bem difundido entre as leveduras e dependente da temperatura, do pH e do substrato (Morace et al, 1984).

Polonelli et al (1983), enfatizaram o uso destas toxinas como um método de tipagem de leveduras, o que poderia funcionar como um importante marcador biológico e epidemiológico.

O fenômeno “Killer” ocorre em substratos específicos como: frutas, vegetais em decomposição, solo, em processos fermentativos (Criseo et al, 1995) e em grãos de milho (Nout et al, 1997).

Num estudo de Vadkertiová & Sláviková (1995), com 46 cepas (12 leveduras) isoladas de água e de sedimento aquático, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus albidus* apresentaram as melhores atividades “Killer” frente a basidiomicetos e ascomicetos.

Boekhout & Scorzetti (1997), distinguiram dez biotipos segundo a sensibilidade a toxinas “Killer” para *Cryptococcus neoformans* estudando 122 cepas clínicas e saprofíticas da variedade *neoformans* e 32 cepas da variedade *gattii*.

Criseo et al (1999), relataram efeito “Killer” contra *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* sorotipo A, em diferentes valores de pH, utilizando leveduras isoladas do mesmo ambiente de *Cryptococcus neoformans*. *Candida parapsilosis*, *Candida famata* e *Pichia carsonii*, tiveram maior atividade contra o agente em valores de pH 4,6 , 5,0 e 5,6, comuns em fezes de pombos e de outras aves.

Baroni (2001), demonstrou a ação das toxinas “Killer” entre 93 isolados de *C. neoformans* de material de pombos (ninho, ovos e excretas), em torres de Igreja. Verificou 88,5% biótipo II, 17,24% biótipo I, um isolado biótipo VII e quatro isolados do biótipo VIII. De acordo com esta biotipagem evidenciou o predomínio da variedade *neoformans* naqueles materiais.

2.5 – Epidemiologia:

Muitos autores defendem que a via de infecção no homem, para *Cryptococcus neoformans*, é a inalatória, pela inalação de leveduras dessecadas ou basidiósporos (Levitz, 1991 ; Passoni et al, 1998 ; Casadevall & Perfect, 1998), que estão presentes em variados locais de ocupação humana, como celeiros, galpões, praças, residências e estabelecimentos comerciais.

A levedura pode manter-se latente em um indivíduo saudável e vir a causar infecção quando o sistema imunológico encontrar-se debilitado (Garcia-Hermoso et al, 1999). Seja por quadros patológicos como também por quadros medicamentosos, exemplificando a corticoterapia (Ramos-Barbosa et al, 2004).

Segundo Casadevall & Perfect (1998), há evidências de que os pulmões sejam a primeira via de infecção. Suportam essa teoria diversos fatores como: isolamento do agente do ar, tamanho das partículas proporcionais aos alvéolos pulmonares, lesões granulomatosas pulmonares em pacientes portadores de criptococose (Salyer et al, 1974), isolamento de escarro e a pneumonia criptocócica antecedente ao quadro de meningite.

Cryptococcus neoformans já foi isolado de úlceras de portadores de HIV (Friedman et al, 1994) e em infecções intestinais (Jacobs et al, 1984 ; Bonacici et al, 1990).

No entanto testes realizados em camundongos imunocomprometidos infectados com *Cryptococcus neoformans* por instilação nasal e retro-orbital, evidenciaram o caráter

infiltrativo desse agente, atingindo desde a submucosa ao periósteo e até as meninges (Gomes et al, 1997). O que sugere que outras vias de entrada podem existir.

De acordo com Passoni et al (1999), na cidade do Rio de Janeiro, pacientes portadores de HIV, expostos à variedade *neoformans*, no ambiente doméstico, apresentavam risco de criptococose duas vezes maior que os pacientes portadores de HIV não expostos ao fungo em seus domicílios.

Pappas & Perfect (1999), sugerem que dentre os principais fatores predisponentes a criptococose, nos HIV negativos, encontra-se a corticoterapia, transplante de órgãos, falência de órgão, diabetes mellitus, doenças reumatológicas, doenças pulmonares crônicas, doenças hematológicas ou outras patologias de caráter maligno. Em crianças é rara mas geralmente associada ao HIV e outras desordens imunológicas (Leggiadro et al, 1991).

Os pacientes portadores de HIV no entanto, representam a maioria dos casos de criptococose, sendo esta a principal causa micológica de morbidade e de mortalidade, segundo Rozenbaum & Rios-Gonçalves (1994), e a quarta infecção mais freqüente entre eles (Kovacs & Kovacs et al, 1985). Em trabalhos mais recentes esses dados não variaram muito. Atualmente 12 % dos aidéticos possuem criptococose, no Brasil, com elevadas morbidades e mortalidades (Nishikawa et al, 2003).

A criptococose é mais freqüentemente isolada em adultos. No Brasil, Darzé et al (2000), analisando casos de criptococose, ocorridos entre 1972 a 1996, em pacientes com idades variáveis de 8 meses a 79 anos, verificaram que um terço dos casos ocorreu em indivíduos com idade inferior a 15 anos.

Souza et al (2004), isolaram e identificaram o agente da criptococose de pacientes humanos entre 20 e 40 anos, em Goiânia-GO-Brasil, sendo 47 positivos para variedade *neoformans*, 3 para a variedade *gattii* e 3 para *Cryptococcus albidus*. A maioria era de portadores de HIV. No entanto 3 isolados de *C. albidus* e 1 de var *gattii* foram isolados de pacientes HIV negativos. Oliveira et al (2004), fizeram um levantamento de 10 anos do Hospital Universitário de Santa Maria-RS-Brasil, de 1993 a 2003, e verificaram 91 pacientes com criptococose, dos quais 88 era, HIV positivos e 3 negativos. Havia dois isolados da variedade *gattii* entre os HIV negativos e o restante era pertencente à variedade *grubii*.

Estudos recentes, no Brasil, têm demonstrado que a percentagem de crianças infectadas vem aumentando (Pappalardo & Melhem, 2003).

Quanto à distribuição dos sorotipos, a variedade *neoformans* sorotipo A é isolada mundialmente e é a mais freqüente em pacientes portadores de HIV (Shimizu et al, 1986 ; Rinaldi et al, 1986 ; Rozembaum et al, 1990 ; Mitchel & Perfect, 1995), sendo a variedade *gattii* extremamente rara nos pacientes com HIV, mesmo nas áreas tropicais e subtropicais onde é encontrada (Dromer et al, 1992), afetando principalmente indivíduos imunocompetentes na maioria dos casos (Pappalardo & Melhem, 2003).

Na Amazônia a criptococose por *C. neoformans* var *gattii* é endêmica e manifesta-se na forma de meningoencefalite. Além dos isolamentos de ocos de arvores e de excretas de pombos, a poeira domiciliar, areia contaminada com excretas de galinhas servem como fonte de *C. neoformans* var *gattii* nessa região e como também tábuas de madeira em decomposição usadas em construções (Neves et al, 2004).

Soares et al (2005), analisaram 79 amostras de fezes de pombos, em Santos-SP, encontrando em 13,9% *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A), 12,6% de *Cryptococcus albidus* e 8,9% de *Cryptococcus laurentii*. Treze destas amostras eram provenientes de instituições de saúde.

No Brasil, Lacaz & Rodrigues (1983), em estudo retrospectivo de 25 casos anteriores a pandemias do vírus HIV (1946 a 1976) relataram uma incidência de 56 % para o sorotipo A, 36% para o sorotipo B e 8% para o sorotipo D.

Sant'anna et al (1997), analisaram 337 amostras de *C. neoformans* de líquido de pacientes com neurocriptococose, em sete cidades do Estado de São Paulo, verificando 90,2 % associadas a portadores de HIV e apenas 2,97% pertencentes à variedade *gattii*.

Um estudo realizado no Brasil por Nishikawa et al (1999), com 386 isolados de casos clínicos de criptococose e com 80 isolados de ambiente, mostrou uma prevalência do sorotipo A (77,9%), seguido dos sorotipos B (18,2%), AD (1,3%), D (0,43%) e C (0,21%).

Fernandes et al (2000), estudando 50 casos de criptococose meningoencefálica associada a portadores de HIV em Goiânia, verificaram a incidência de 94% para variedade *neoformans*. Em um levantamento feito por Kobayashi et al (2005) de outubro de 2001 a abril de 2002, foram registrados 60 casos de criptococose em Goiânia.

2.6 – Patogenia:

2.6.1 – No Homem:

Na criptococose do sistema nervoso central, os sinais e sintomas são relativos ao envolvimento das meninges, ou ao aumento da pressão intracranial: dores de cabeça, febre, desorientação, vertigem, ambliopia, rigidez da nuca, tonturas, hiporreflexia, sonolência, vômitos, afasia e paralisia dos nervos cranianos, podendo levar a óbito (Mitchel, 1983; Crissey et al, 1995; Pappalardo, 2002).

A criptococose pulmonar é menos freqüente que a do SNC e pode ser dividida em primária ou secundária. Na primária temos pequenos focos de infecção pulmonar e pode resolver-se espontaneamente. Já na secundária a criptococose ocorre após uma doença base que debilita o indivíduo como: diabetes, doenças renais e neoplasias (Mitchel, 1983; Crissey et al, 1995).

Podem ocorrer casos sistêmicos, afetando pele e mucosas (Mitchel, 1983), endoftalmite (Crump et al, 1992), coriorretinite (Bibas et al, 1993) e peritonite com disseminação para vários órgãos (Yinnon et al, 1993).

2.6.2 – Nos animais:

Nos animais infecções por fungos no sistema nervoso são incomuns, incluindo-se a criptococose e, pode-se realizar o diagnóstico, por sorologia, citologia, biópsia e cultura de líquido (Lavelly et al, 2005). O sorotipo A (variedade *grubii*) é o mais isolado de lesões em animais (Benett et al, 1977).

O primeiro caso de criptococose em animais foi relatado por Sanfelice, em 1894, isolando a levedura de um linfonodo de um bovino com carcinoma hepático. Nos casos de mastite em bovinos, os primeiros sinais, quando por *Cryptococcus neoformans* são a diminuição do fluxo de leite, tumefação e rigidez do úbere, hipertrofia ganglionar linfática e anorexia. O leite fica viscoso com coloração branca a acinzentada. No entanto muitos podem desenvolver quadros subclínicos (El Manual Merck de Veterinária, 1981). A patologia pode ser provocada pela contaminação das tetas dos animais no solo, durante a coleta ou por aplicações injetáveis com instrumentos contaminados (Simon et al, 1953).

Nos felinos, a criptococose pode ocorrer com exsudato nasal e ocular, cegueira, incoordenação, febre, tosse, tumefação na cavidade nasal e faríngea, com formação de massas expansivas pela invasão de *C. neoformans*, podendo atingir o sistema nervoso central. Em alguns relatos, restringe-se a quadro respiratório crônico ou a massas subcutâneas tumorais (El Manual Merck de Veterinária, 1981; Malik et al, 1992; Chiesa, 1998). Essa infecção em felinos prevalece em áreas tropicais e subtropicais (Wilkinson, 1984), sendo que na infecção respiratória há a formação de uma massa poliposa, que se exterioriza pelas narinas, conhecida

como “nariz de palhaço” (Chagas et al, 1971; Scott et al, 1995). Linfadenite granulomatosa, granuloma mediastínico e granulomas gerais em felinos também são descritos por Meadows et al (1993) e Ramos-Vara et al (1994).

Nos cães, a infecção por *Cryptococcus neoformans* afeta o cérebro e as meninges com formações císticas e inflamação mucopurulenta nos seios paranasais. Há quadros clínicos de sintomas nervosos e exsudação nasal, observados por Lester et al (2004) em 15 cães no Canadá, infectados pela variedade *grubii* e *gattii* (sorotipo B). Granulomas subcutâneos próximos às orelhas, na face e nas patas podem ocorrer (El Manual Merck de Veterinária, 1981 ; Corazza et al, 1991 ; Linchtensteiter & Hilf, 1994). Pode causar infecções sistêmicas como foi relatado por Newman et al (2003), em um caso de um cão labrador com pielonefrite por *C. neoformans*.

Em animais domésticos existem vários relatos de criptococose associada a fatores predisponentes como: imunodeficiência felina (Ferrer, 1992 e Ramos-Vara, et al, 1994), defeitos genéticos em cães e pelo uso de esteróides em gatos (Faggi et al, 1993).

Nos cavalos, a criptococose promove sinais respiratórios e exsudato nasal como resultado de granulomas nasais, que ocorrem também nos pulmões, nas vísceras e subcutâneo (Watt, 1970 ; Roberts et al, 1981 ; Chandna et al, 1993). Outros quadros também foram observados como: aborto (Blanchard & Filkins, 1992) e granuloma abdominal associado a pneumonia criptocócica, causada pela variedade *gattii* (Riley et al, 1992).

Em ovinos, foram observadas lesões de pele, nasais, traqueais e pulmonares (Chapman, 1990). Há relatos, em camelos, de linfadenite crônica por *C. neoformans* (El-Sergany et al, 1991).

Existem vários relatos de criptococose em animais silvestres como: macacos (*Macaca cyclopis* e *Macaca mullata*) (Garner et al, 1969 ; Pal et al, 1984), Sucuri (*Eunectes murinus*) (McNamara et al, 1994) e coalas (*Phascolarctos cinereus*) (Spencer et al, 1993).

A criptococose aviária é rara mas já foi relatada em alguns estudos na Austrália (Malik et al, 2003) e no Brasil (Raso et al, 2004). Afetando aves imunodeprimidas e imunocompetentes, levando a quadros de infecção subcutânea e/ou rinite micótica, e de pneumonia e infecção sistêmica respectivamente (Malik et al, 2003). Sete casos foram relatados no Brasil, em *Charmosyna papou*, *Lorius lory*, *Trichoglossus goldiae*, *Psitaculla krameri* e *Psitacula erithacus*, com quadros de alterações progressivas de SNC e com lesões respiratórias, associados ao isolamento da levedura de órgãos e das fezes destas aves (Raso et al, 2004).

2.7 -Fatores de Virulência:

Os fatores que fazem *Cryptococcus neoformans* um patógeno, compreendem as características necessárias ao estabelecimento da infecção, com sobrevivência do hospedeiro e os fatores de virulência que afetam o grau de patogenicidade (Buchanan & Murphy, 1998).

Dentre os fatores de virulência existentes, a cápsula (Chang & Kwon-Chung, 1994) é um dos principais, seguido por outros fatores como: produção de manitol e assimilação do inositol (Casadevall & Perfect, 1998), aderência (Merkel & Scofield, 1993), produção de melanina (Jacobson & Tinnel, 1993), produção de urease (Cox et al, 2000), produção de fosfolipase e de protease.

2.7.1 – Cápsula:

Estudos com cepas de *Cryptococcus neoformans* capsuladas e acapsuladas mostram que as cepas desprovidas de cápsula são menos virulentas (Fromtling et al, 1982). A produção capsular é dependente de genes específicos, como CAP59, CAP60, CAP64 e CAP10

(Casadevall & Perfect, 1998 ; Chang & Kwon-Chung , 1996). A cápsula confere à levedura, proteção contra a fagocitose (Tabeta et al, 1991), propicia repulsão eletrostática entre o agente e as células de defesa do hospedeiro, facilitando a patogênese (Nosanchuk & Casadevall, 1997) e ainda seus antígenos capsulares (GXM-Glicuronoxilomanose, GALXM-Galactoxilomanose e MP-Manoproteínas) diminuem a inflamação, por inibir a migração de leucócitos.

2.7.2 – Manitol e Inositol:

Cryptococcus neoformans secretam D-manitol, fato relatado por Wong et al (1990), e por Jacobson & Emery (1991). A alta concentração no sistema nervoso causa a formação de edemas que protegem esta levedura contra processos oxidativos (Wong et al 1990 ; Denning et al, 1991), relacionando-se também com aumento na resistência ao calor e à pressão osmótica (Casadevall & Perfect, 1998).

A contribuição do inositol para a virulência relaciona-se ao fato de servir como um metabólito importante na biossíntese de fosfolipídios de membrana e nos mecanismos de transdução de sinais (Vicent & Klig, 1995 ; Casadevall & Perfect, 1998).

2.7.3 – Aderência:

Cepas capsuladas ou não capsuladas podem produzir adesinas, específicas para receptores presentes no sistema nervoso e no pulmão, sendo as acapsuladas consideradas três vezes mais aderentes (Merkel & Scofield, 1993 ; Merckel et al, 1994).

2.7.4 – Melanina:

Cepas mutantes de *Cryptococcus neoformans* não produtoras de melanina são consideradas com menor virulência (Rhodes et al, 1982). A produção de melanina ocorre pela ação da fenoxidase, convertendo dihidroxifenóis até dopaquinona, que forma dopacromo, polimeriza-se em melanocromo e, por fim, em melanina (Polacheck & Kwon-Chung, 1980 ; Torres-Guerrero & Edman, 1994). Para que essa reação ocorra, há necessidade de um ambiente propício, rico em catecolaminas como o é tecido cerebral. A função da melanina é neutralizar oxidantes (Jacobson & Tinnel, 1993) e aumentar a resistência frente à fagocitose e a antifúngicos (Wang et al, 1995).

2.7.5 – Urease:

Em estudo de Cox et al (2000), produziram cepas de *C. neoformans* não produtoras de urease, originadas após o rompimento do locus genômico da enzima (URE1), inoculadas em coelhos sob corticoterapia, não apresentaram diferenças significativas em relação as cepas produtoras de urease. Estes animais apenas sobreviveram por um período maior.

2.7.6 – Fosfolipases:

Vidotto et al (1996), estudando 23 cepas de *C. neoformans* verificaram que 22 destas produziam fosfolipase, com um pz (relação entre o diâmetro da colônia e a soma do diâmetro da colônia mais a zona de precipitação) de 0,271 a 0,949 e fizeram uma correlação entre a produção de fosfolipase e o tamanho da cápsula das cepas .

Chen et al (1997), estudando 50 isolados de *C. neoformans* identificaram 49 amostras positivas para produção de fosfolipase, havendo uma fosfolipase B, lisofosfolipase e uma

lisofosfolipase-transacilase. No mesmo ano, em outro trabalho, identificaram a produção de fosfolipase em *C. neoformans*, por espectroscopia de ressonância magnética e por cromatografia de camada delgada com fosfatidilcolina e lisofosfatidilcolina a presença da fosfolipase B, e ausência de fosfolipases C e D.

Vidotto et al (1998), observaram em estudo com 67 cepas isoladas de pacientes portadores de HIV e de excretas de aves, diferenças significativas na produção de fosfolipase com relação ao tamanho da cápsula e habilidade de crescimento a 37°C e em outras temperaturas de incubação. Demonstraram uma alta prevalência na distribuição da atividade fosfolipásica de cepas isoladas de portadores de HIV, sugerindo que a fosfolipase tenha uma função na invasão do hospedeiro.

Santangelo et al (1999) realizaram uma pesquisa através da espectroscopia por ressonância magnética nuclear para caracterizar a atividade de enzimas extracelulares de *Cryptococcus neoformans*, observando uma maior atividade enzimática entre 25°C e 40°C. Por ruptura celular constataram que mais de 85% das atividades de fosfolipase foram associadas com células que produziam lisofosfolipase e lisofosfolipase-transacilase, mais facilmente liberadas do que a fosfolipase B.

Baroni (2001) observou a produção fosfolipase por 90,8% dos isolados de *C. neoformans*, coletados de materiais de pombos (ninho, ovo, excretas) e do solo de ambientes abertos (Parques públicos), na Cidade do Rio de Janeiro. Destas cepas, 50,6% apresentaram Pz = 3 (fortemente produtoras).

Wright et al (2004) analisando a produção de fosfolipase por cepas de *C. neoformans* variedade *gattii*, identificou uma nova lisofosfolipase a LPL1. Nessa variedade só havia até então relatos de LPL (lisofosfolipase) e LPTA (lisofosfolipase-transacilase).

A fosfolipase B é importante na infecção pulmonar pelo *C. neoformans*, pois indiretamente facilita a aderência da levedura ao epitélio pulmonar. A PLB1 (fosfolipase B) age sobre os substratos do hospedeiro liberando ácidos graxos, que agem sobre as membranas celulares e no surfactante expondo sítios de ligação para a levedura aderir. Cepas produtoras de PLB1 em estudo mostraram-se 69% com mais capacidade de aderência comparadas as não produtoras (Ganendren et al, 2006).

Vidotto et al (2005), avaliaram a produção de fosfolipase em isolados de *C. neoformans* de portadores de HIV, cedidos pelo Adolfo Lutz (São Paulo). Observaram a produção de fosfolipase por todas as 151 amostras analisadas, sendo que a maior parte possuía um Pz de 0,69 a 0,4, considerados de médio a forte produtores no oitavo dia de incubação a 37°C. Também observaram que há uma grande variação quando associamos a produção ao tempo de incubação, pois no 4º dia a maioria tinha um Pz entre 1 e 0,7 e no 8º dia passaram para um Pz de 0,699 a 0,4. Mostraram a importância de avaliarmos a produção simultaneamente ao tempo de incubação a 37°C.

Abegg et al (2006) observaram a produção de fosfolipase por 50% de isolados de *C. neoformans* de Psitaciformes, do Zoológico de Sapucaia do Sul, Rio grande do Sul – Brasil. Com valores de Pz de 0,69 a 0,94, sendo a média 0,83 de 38 amostras analisadas.

2.7.7 – Proteínases:

As proteínases degradam tecidos do hospedeiro ou destroem proteínas imunologicamente importantes. O *C. neoformans* possui baixa atividade proteolítica, degradando imunoglobulinas e parte do sistema complemento no local da infecção (Casadevall & Perfect, 1998). Brueske (1986), relatou a síntese de protease extracelular por cepa clínica, isolada de lavado bronquial, cultivada em meio definitivo, desprovido de sulfato de amônia, e suplementado com soroalbumina bovina, como única fonte de carbono e nitrogênio.

Aoki (1994), analisou oito cepas de *C. neoformans* originadas de portadores de HIV, cultivadas em meio “Yeast Carbon Base” (YCB) acrescido de 0,1% de soroalbumina bovina (BSA), e 0,01% de polipeptona. Todas as oito cepas apresentaram zona clara proteolítica em torno das colônias, tendo um menor crescimento e uma menor atividade proteolítica em meio YCB suplementado somente com BSA. Os resultados sugeriram a importância da polipeptona nos estágios iniciais para o crescimento rápido da levedura.

Chen et al (1996), estudaram a atividade de proteinase extracelular em oito cepas de *C. neoformans* variedade *neoformans* e duas cepas de *C. neoformans* variedade *gattii*. As atividades proteolíticas das leveduras foram verificadas em Agar proteína, pela hidrólise de azoalbumina, liquefação de gelatina e eletroforese em gel de policrilamida. Todas as cepas apresentaram atividade proteolítica extracelular, e capacidade para utilizar imunoglobulina murina G1, imunoglobulina bovina G e o fator complemento 5.

Recentemente foi desenvolvido um estudo envolvendo amostras de *C. neoformans* variedade *grubii* isoladas de excretas de pombos, todas não produtoras de proteinase e 44% suscetíveis ao fluconazol. Evidenciaram que após a inoculação de cepas não produtoras de proteinase 17% passaram a produzir proteinase, sendo 25 % sensíveis ao fluconazol (Gonçalves da Silva et al, 2004).

Vidotto et al (2005) avaliaram 151 cepas de *C. neoformans* de portadores de HIV, em São Paulo – Brasil. Todas apresentaram produção de proteinase, sendo a maioria fortemente produtora no 8º dia de incubação a 37°C, com valores de Pz entre 0,399 e 0,00 (80,79%). Também observando a importância do tempo de incubação, pois até o 4º dia a maioria das cepas avaliadas tinha valores de Pz entre 0,699 e 0,40, que diminuíram no oitavo dia.

2.8 – Métodos de Tipagem:

Bennet et al (1977), analisaram os diferentes pares de sorotipos de *C. neoformans*, quanto à utilização de ácido fumárico, ác. succínico e ac. L-málico. Como resultado foi observado que esses ácidos foram assimilados por 100% dos sorotipos B e C na forma perfeita, sendo os sorotipos A e D apenas 43% e 22% respectivamente, na forma anamorfa esses percentuais caem para 17% e 0%. Desde então meios de cultura para diferenciar os sorotipos pelas diferenças metabólicas foram sendo desenvolvidos.

Kwon-Chung et al (1976), criaram um meio com creatinina, dextrose e azul de Bromotimol (CDB), que não separava os sorogrupos, mas favorecia o crescimento de *C. neoformans* com relação a outras espécies de leveduras. Salkin et al (1982), desenvolveram outro meio combinando glicina, cicloheximida, com vermelho de fenol, observando uma maior assimilação da glicina por 88% das cepas de variedade *gattii* e 20% de assimilação pelo sorotipo A e nenhuma pelo sorotipo D.

Kwon-Chung et al (1982), substituíram a cicloheximida por L-canavanina e a glicose e a creatinina por 1% de glicina, denominando o meio de CGB (Canavanina, Glicina e Azul de Bromotimol). O funcionamento do meio ocorre pela assimilação da glicina e pela resistência a canavanina, apresentada pelos sorotipos B e C (variedade *gattii*). A assimilação da glicina por poucas cepas do Sorotipo D não influencia o resultado devido à sensibilidade a canavanina apresentada pela variedade *neoformans*.

Um outro método de tipagem preconizado para leveduras, incluindo *C. neoformans*, é a tipagem “Killer”, através das micocinas ou toxinas “Killer”, substâncias que inviabilizam outras leveduras e fungos. Essas micocinas são produzidas pelas leveduras em substratos como frutas, vegetais em decomposição, solo, processos fermentativos (Criseo et al, 1999) e em ambientes aquáticos (Vadkertiová & Slaviková, 1995). Boekhout & Scorzetti (1997), relataram dez tipos diferentes de sensibilidade para *C. neoformans* (quatro para variedade *neoformans* e seis para a variedade *gattii*).

Métodos genotípicos também são usados para caracterizar as cepas de *Cryptococcus neoformans*, como a RFLP (“Restriction Fragment Length Polimorphism”) (Pfaller, 1992), o PCR (“Polimerase Chain Reaction”) amplificando segmentos específicos de DNA, PFGE (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”) separando as bandas de DNA e a cariotipagem (Perfect, 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Escolha das lojas de animais (“pet shops”):

O Município do Rio de Janeiro por ser uma grande metrópole apresenta um grande número de estabelecimentos que comercializam animais (“pet shops”), incluindo as aves. Para este estudo, diversos “pet shops” foram abordados. Embora de forma aleatória, buscamos ambientes com um grande acúmulo de excretas de aves. Para a realização das coletas foram encaminhados oficiais do Laboratório de Leveduras da UFRRJ (Anexo 1) informando a importância do trabalho que estava para se realizar nas lojas selecionadas. As lojas, cujos gerentes permitiram a coleta foram então as selecionadas, chegando ao número de 25 lojas. A seleção das lojas e a coleta foram realizadas entre fevereiro de 2002 e agosto de 2003.

3.2 – Amostragem em lojas selecionadas:

Utilizando-se máscaras e luvas, e portando colheres plásticas e sacos plásticos padronizados (zip-loc pequenos), de fácil vedação, efetuaram-se coletas de excretas de aves domésticas de diversas espécies nos 25 estabelecimentos. As amostras foram coletadas mensalmente no período de fevereiro de 2002 a agosto de 2003. Cinco dos estabelecimentos tiveram apenas 2 a 4 coletas por motivos de falência ou restrição da coleta pela gerência. As excretas foram coletadas do fundo das gaiolas, nas quais estavam depositados sobre diferentes materiais, como folhas de jornal, folhas plásticas e areia. As excretas depositadas pelas aves sobre estes materiais foram recolhidas com a colher plástica, coletando excretas recentes e já ressecadas, carreando juntamente restos alimentares (sementes, rações) e plumas.

Foram realizadas coletas de 11 diferentes espécies frequentemente encontradas nos “pet shops” selecionados, como pombo (*Columba spp.*), rolinha diamante (*Geopelia cuneata*), agapornis (*Agapornis spp.*), calopsita (*Nymphicus hollandicus*), periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*), mandarim (*Poephila guttata castanotis*), diamante de gould (*Chloebia goldiae*), canário belga (*Serinus canaria*), manon (*Lonchura domestica*), calafate (*Padda oryzivora*) e star finch (*Neochmia ruficauda*). O número de animais por gaiola foi bastante variável desde um indivíduo sozinho a grupos de dezenas de animais, sendo o tamanho das gaiolas bastante diversificado.

3.3 – Processamento das amostras:

O material colhido nas lojas, acondicionado em sacos plásticos, foi transportado para o Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (LLPA) do DMIV (Departamento de Microbiologia do Instituto de Veterinária) da UFRRJ, sendo mantidas sob refrigeração até o momento do processamento.

As amostras foram pesadas, variando de acordo com o volume coletado, de 5 a 10 gramas, diluídas na proporção de 1:10 em salina com cloranfenicol (concentração de 200mg/L) contidas em frascos de Erlenmeyer de 500ml de acordo com Baroni (2001) e homogeneizadas por agitação magnética. As amostras de fundos de areia foram processadas as excretas juntamente com o pouco de areia carregada, nos outros substratos do fundo das gaiolas (plástico e jornal) apenas as excretas juntamente com restos alimentares e plumas foram processados. Após um período de 30 minutos de repouso para separação das fases, uma alíquota de 1mL do sobrenadante foi retirada por pipetador automático calibrado e provido com ponteiros descartáveis esterilizados, sendo semeada em duplicata no meio ágar Sabouraud-dextrose a 4% e em duplicata no meio com dopamina (Anexo 2), contidos em

placas de Petri. Esses procedimentos em duplicata foram realizados por se tratar de um material muito contaminado por bactérias e outros fungos aumentando as chances do isolamento da levedura. A distribuição foi feita de forma uniforme sobre a superfície com alças de Drigalski esterilizadas. Este procedimento foi executado em cabine de segurança biológica classe II. As placas foram incubadas na temperatura de 32°C, realizando-se leituras diárias do 3º até o 15º dia. Essa temperatura de incubação foi escolhida na tentativa de isolar outras espécies do gênero *Cryptococcus*, como o *Cryptococcus albidus*.

3.4 – Leitura dos isolados:

No meio contendo dopamina (Anexo 2) as colônias cremosas com coloração de marrom claro a enegrecido e no ágar Sabouraud-dextrose 4% colônias cremosas e de coloração creme foram selecionadas e isoladas como suspeitas, após 48 a 72 horas de incubação em 32°C. Em meio com dopamina colônias de *C. neoformans* tomam uma coloração marrom à enegrecida por produzirem fenoloxidase que transforma a dopamina em melanina. Destas colônias suspeitas, pequenas porções foram retiradas para preparo de lâmina visando avaliação microscópica, utilizando-se Lactofenol de Amann azul de algodão e ou nigrosina. Após a microscopia as colônias que continham células compatíveis com as de *Cryptococcus neoformans* (redondas, ovais com ou sem brotamento) foram retiradas em pequenas porções, diluídas em salina e semeadas pelo método de esgotamento da alça microbiológica em novas placas de Petri contendo meio com dopamina, todo procedimento realizado em duplicata. Na etapa seguinte as colônias com confirmação da produção de pigmentação melânica, de cores marrons claras a negras (Figura 1), foram transferidas para tubos de ensaio contendo o meio ágar Sabouraud-dextrose 4% (Figura 2), incubadas em 32°C por 48 a 72 horas, sendo estes identificados de acordo com a origem da amostras avaliadas e conservados em temperatura de refrigeração para posteriores testes de identificação.



Figura 1. Colônias de *C. neoformans* em meio contendo dopamina (anexo 2), de coloração marrom pela ação da enzima fenoloxidase produzida pela levedura que atua sobre a molécula de dopamina transformando em melanina.



Figura 2. Colônias de *C. neoformans* isoladas em meio ágar Sabouraud-dextrose 4% em cultivo em tubo inclinado, apresentando colônias cremosas claras características da levedura em cultivos recentes.

3.5 – Identificação de *Cryptococcus neoformans* (Kreger-van Rij, 1984; Kurtzman & Fell, 1998):

As colônias que em meio dopamina apresentaram-se com coloração escura foram testadas para produção de urease em meio de Christensen (Anexo 3; Figura 3), o não crescimento em meio contendo cicloheximida e a testes bioquímicos de assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas (auxanograma) e de fermentação negativa de açúcares. Foi utilizada como controle a cepa de *C. neoformans* ICB-USP – 162. Após esse processo 85 amostras positivas identificadas de 19 lojas de animais foram selecionadas para as próximas etapas.



Figura 3. Meio de Christensen com reação positiva para produção de urease após semente de amostra de *C. neoformans* isolada de excretas de aves, pela ação da enzima produzida sobre a uréia alterando o ph do meio passando da coloração amarelada a avermelhada.

3.6 – Sorogrupagem em meio C.G.B. (Kwon-Chung et al, 1982):

As cepas isoladas e confirmadas como pertencentes à espécie *Cryptococcus neoformans* foram submetidas à sorogrupagem em meio C.G.B. (L-Canavanina, Glicina e Azul de Bromotimol) (Anexo 4). Neste meio, as cepas pertinentes aos sorotipos A e D são impossibilitadas de crescimento devido ao fato de serem sensíveis a canavanina. As cepas pertinentes aos sorotipos B e C, são resistentes a canavanina, desenvolvendo-se no meio e ao fazerem uso da glicina alteram o ph do meio, tornando-o azul cobalto.

Na determinação dos sorogrupos, as cepas previamente repicadas e incubadas a 32°C por 48 horas em Sabouraud-dextrose 4%, foram semeadas em um ponto único no centro de placas de Petri de 50 mm de diâmetro contendo o meio C.G.B, em cabine de segurança biológica, sendo os testes realizados em duplicata com incubação em 32°C. As leituras foram diárias, até o 7º dia, observando-se a ocorrência ou não de crescimento e mudança ou não da coloração para o azul. Cepas padrões das variedades *neoformans* e *gattii*, ICB-USP – 162 e ICB-USP - 163 respectivamente, foram empregadas como controles.

3.7 – Determinação da Virulência:

3.7.1 – Produção de Fosfolipase (Price et al., 1982):

As amostras selecionadas e um controle positivo (*Candida albicans* 12 A do LLPA) foram repicados em ágar Sabouraud-dextrose 4% e incubadas a 32°C por 48 horas. Depois, foram semeadas em um ponto único central na superfície do meio ágar fosfolipase (Anexo 5) em placas de Petri descartáveis de 90 mm com incubação a 32°C por até 15 dias. Os testes foram realizados em duplicata. A produção dessa enzima promove uma precipitação de CaCl_2 (Figura 4). Para confirmar a produção de fosfolipase medimos o diâmetro do halo de precipitação formado ao redor da colônia e o diâmetro da colônia (Price et al, 1982; Vidotto et al., 1996). A partir dessas medidas obtemos o valor da atividade fosfolipásica, denominada Pz, através da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro formado pelo halo (zona de precipitação), sendo classificadas conforme a Tabela 1.



Figura 4. Produção de fosfolipase positiva, representada pela formação do halo de precipitação de sais de cálcio ao redor da colônia central de *Candida albicans* (controle 12A-LLPA).

Tabela 1 - Atividade enzimática de acordo com PRICE et al, 1982

Pz	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	CÓDIGO
= 1,0	NEGATIVA	1
$\geq 0,64 < 1,0$	POSITIVA	2
$< 0,64$	FORTEMENTE POSITIVA	3

3.7.2 – Produção de Protease (Ruchel et al., 1982):

As amostras selecionadas e um controle positivo (*Candida albicans* 12A-LLPA) foram repicados em tubos de ensaio com ágar Sabouraud-dextrose 4% e incubadas por 48 horas a 32°C. Para essa avaliação um meio em cuja constituição há soroalbumina bovina (fração V-Sigma) (Anexo 6) foi semeado com uma pequena alíquota da amostra suspeita, em um ponto único e central do meio contido em placas de Petri, em duplicata, com incubação em 32°C por até 15 dias. Para verificar a produção de protease foram medidos o diâmetro do halo da zona de degradação do substrato formado ao redor da colônia e o diâmetro da colônia (Figura 5) (Price et al, 1982; Vidotto et al., 1996). A partir dessas medidas determinou-se o valor da atividade proteolítica enzimática, denominada Pz, através da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro formado pelo halo, sendo classificadas conforme a Tabela 1.



Figura 5. Colônia única central de *C. neoformans* em meio ágar protease apresentando halo de degradação de proteínas, ao redor da colônia, pela produção de protease, isolado P9B11 conforme a tabela 4.

3.8 – Biotipagem por toxinas “Killer” (Boekhout & Scorzetti, 1997):

Os isolados foram repicados 48 horas antes em meio ágar Sabouraud-dextrose 4% com incubação a 32°C. Destes repiques, foram feitas diluições padronizadas de acordo com o valor 0,5 da escala de McFarland. Placas de petri com 90 mm de diâmetro foram previamente preparadas e identificadas, para que 3 mL das suspensões fossem vertidas e a seguir 10 mL do meio YEPD modificado (Anexo 7) fundido e resfriado na temperatura de 50°C. Cada placa, preenchida, foi submetida a movimentos “em oito” para homogeneização.

As placas com os meios já solidificados receberam cada uma das seis cepas padrões. Anteriormente a essa etapa as cepas padrões foram repicadas em um meio de ativação, o YPGA (Anexo 7), e incubadas a 25°C por 7 dias, temperatura de incubação que favorece o crescimento de todas as cepas padrões. A aplicação dos padrões foi realizado com a alça microbiológica, em pequenos pontos equidistantes entre si e afastados 10 mm da parede da placa, no sentido horário. As cepas padrões utilizadas estão mantidas na micoteca do LLPA-DMIV-IV-UFRJ e foram cedidas pelo Laboratório de Leveduras seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do ICB/USP e aplicadas na seguinte ordem:

CBS 139 *Cryptococcus laurentii* (Kufferath)
 CBS 4736 *Filobasidium capsuligenum* (Rodrigues de Miranda)
 CBS 7235 *Cryptococcus laurentii* (Kufferath)
 CBS 7717 *Cryptococcus podzolicus* (Bad'eva & Reshetova)
 CBS 7857 *Cryptococcus laurentii* (Kufferath)
 CBS 4281 *Cryptococcus humicola* (Daszewska)

Foram utilizadas cepas controle *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* (ICB-163) e *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii* (ICB-162).

A leitura dos testes foi realizada após 48 horas da incubação a 25°C, diariamente até o 5º dia. As cepas sensíveis aos padrões apresentam halos claros ao redor dos padrões ou por colônias com coloração azulada nessa mesma região da placa, efeito do azul de metileno nas células mortas do isolado testado. A ausência do halo e da pigmentação indicam a não sensibilidade. Foi efetuado a comparação dos padrões de sensibilidade com os biotipos pré-determinados por Boekhout & Scorzetti (1997), na Tabela 2.

Tabela 2. Padrões de sensibilidade para *Cryptococcus neoformans* frente a toxinas “Killer” segundo Boekhout & Scorzetti (1997).

Tipo de sensibilidade	Variedade	Cepas “Killer”					
		139	4736	7235	7717	7857	4281
I	<i>neoformans</i>	-	-	-	-	-	-
II	<i>neoformans</i>	-	+	-	-	-	-
III	<i>neoformans</i>	-	+	+	-	-	-
IV	<i>neoformans</i>	-	+	+	+	-	-
V	<i>Gattii</i>	+	+	+	-	-	-
VI	<i>Gattii</i>	+	+	+	+	-	-
VII	<i>Gattii</i>	+	+	+	+	+	-
VIII	<i>Gattii</i>	+	+	+	-	+	-
IX	<i>Gattii</i>	+	+	+	+	-	+
X	<i>Gattii</i>	+	+	+	-	-	+

+ sensível ; - não sensível;

3.9 – Preservação das amostras:

Das 85 amostras identificadas e isoladas, 56 foram repicadas em ágar Sabouraud-dextrose 4%, incubadas por 72 horas, em tubos de ensaio em camada alta. Identificadas de acordo com a origem e data de coleta. Mantidas em temperatura de refrigeração no Laboratório de Leveduras Patogênicas e ambientais (LLPA) do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do Instituto de Veterinária da UFRJ, Brasil, para estudos posteriores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Isolamento:

Os contatos efetuados com proprietários e com gerentes de lojas por meio do ofício se mostraram efetivos. Apenas duas lojas entre as 27 procuradas não permitiram a coleta. Foram selecionados um número total de 25 estabelecimentos, “pet shops”, sendo que 5 dos estabelecimentos foram contatados somente em Janeiro de 2003.

Os pontos de coleta selecionados distribuíam-se em 16 bairros do município do Rio de Janeiro, a saber: Cachambi, Praça Seca, Cascadura, Grajaú, Centro, Campo Grande, Taquara, Copacabana, Ipanema, Méier, Madureira, Rocha, Tijuca, Inhaúma, Abolição e Pilares.

As coletas foram realizadas entre fevereiro de 2002 a agosto de 2003, com algumas variações mostradas na Tabela 3. Muitos destes estabelecimentos selecionados faliram, desistiram de vender aves ou proibiram a continuidade por desconforto dos gerentes, que não entenderam a importância deste estudo, temendo represálias de uma fiscalização futura.

De um total de 1268 amostras de 25 lojas de animais, no município do Rio de Janeiro, nas quais se buscou o isolamento do *C. neoformans*, verificaram-se 85 amostras positivas (6,70 %) (Tabela 3 e 4).

Até agosto de 2003, 76% dos estabelecimentos pesquisados apresentaram positividade para alguma das amostras analisadas. Mostraram-se positivos os “pet-shops” de números 01 (Pilares), 03 e 04 (Abolição), 06 (Grajaú), 08 (Rocha), 09 (Madureira), 10 e 11 (Méier), 12, 13 e 14 (Centro), 15 (Copacabana), 16 (Ipanema), 17 e 18 (Taquara), 19 e 20 (Campo Grande), 24 (Cascadura) e 25 (Centro), conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Isolamentos de *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de aves coletadas em “pet-shops”, de acordo com o período de coleta mensal e por local

N° da Loja	Local do "Pet shop"	N° de Amostras	N° de meses	Amostras positivas	
				N°	%
1	Pilares	56	Fevereiro/02 a Agosto/03	1	1,78%
2	Pilares	8	Fevereiro/02 a Abril/02	0	0
3	Abolição	47	Fevereiro/02 a Agosto/03	15	31,91%
4	Abolição	27	Fevereiro/02 a Agosto/03	2	7,41%
5	Inhaúma	2	Fevereiro de 2002	0	0
6	Grajaú	42	Fevereiro/02 a Agosto/03	3	7,14%
7	Tijuca	11	Fevereiro/02 a Dezembro/02	0	0
8	Rocha	99	Fevereiro/02 a Agosto/03	3	3,03%
9	Madureira	84	Fevereiro/02 a Agosto/03	9	10,71%
10	Méier	77	Fevereiro/02 a Agosto/03	27	35,06%
11	Méier	12	Fevereiro/02 a Dezembro/02	2	16,66%
12	Centro	78	Fevereiro/02 a Agosto/03	1	1,28%
13	Centro	81	Fevereiro/02 a Agosto/03	1	1,23%
14	Centro	86	Fevereiro/02 a Agosto/03	2	2,32%
15	Copacabana	14	Fevereiro/02 a Maio/02	2	14,28%
16	Ipanema	40	Fevereiro/02 a Agosto/03	1	2,50%
17	Taquara	101	Fevereiro/02 a Agosto/03	6	5,94%
18	Taquara	73	Fevereiro/02 a Agosto/03	1	1,37%
19	Campo Grande	102	Fevereiro/02 a Agosto/03	1	0,98%
20	Campo Grande	92	Fevereiro/02 a Agosto/03	5	5,43 %
21	Cachambi	31	Janeiro/03 a Agosto/03	0	0
22	Praça seca	33	Fevereiro/02 a Agosto/03	0	0
23	Cascadura	22	Fevereiro/02 a Agosto/03	0	0
24	Cascadura	28	Fevereiro/02 a Agosto/03	1	3,57%
25	Grajaú	22	Mai/03 a Agosto/03	2	9,09%
Total		1268		85	6,70%

Na Tabela 4 a origem das 85 amostras de excretas colhidas está identificada, correlacionando as espécies aviárias, número do estabelecimento, período de coleta e o código de identificação.

Tabela 4. Relação das amostras positivas classificadas por “pet shop”, período de coleta e espécies aviárias.

Amostras Positivas coletadas de "pet shops" no Município do Rio de Janeiro			
1- P9A1	canário	44- P10A9	star fish / diamante de gould
2- P12A1	mandarim	45- P10B9	periquito australiano
3- P14A1	canário / calopsita	46- P10C9	manon / mandarim
4- P3C2	periquito australiano	47- P17A9	periquito australiano
5- P11A2	periquito australiano	48- P3A10	canário
6- P3A3	pombo	49- P9A10	periquito australiano
7- P3B3	periquito australiano	50- P10A10	periquito australiano
8- P3C10	rolinha diamante	51- P10B10	star finch / diamante de gould
9- P10C3	periquito australiano	52- P10C10	canário
10- P14C3	agapornis / calopsita / periquito aust.	53- P10D10	calopsita
11- P17B3	manon / mandarim	54- P10E10	manon / mandarim
12- P20B3	agapornis / calopsita	55- P3B11	canário
13- P6B4	periquito australiano	56- P3C11	periquito australiano
14- P6C4	agapornis / calopsita	57- P8C11	manon
15- P9A4	canário / periquito australiano	58- P10B11	star finch / diamante de gould
16- P9B4	agapornis / calopsita	59- P10D11	periquito australiano
17- P10D4	periquito australiano	60- P17B11	canário
18- P15A4	periquito australiano	61- P20D11	calafate
19- P15C4	manon / mandarim	62- P3C12	pombo
20- P16B4	canário / calafate / mandarim / manon	63- P9G14	calafate
21- P19C4	canário / calafate	64- P10C14	manon / mandarim
22- P3A5	periquito australiano	65- P10D14	periquito australiano
23- P3B5	pombo	66- P17B14	agapornis
24- P6A5	canário	67- P17D14	manon / mandarim
25- P8D5	periquito australiano	68- P10B15	canário
26- P9A5	periquito aust. / agapornis / calopsita	69- P10C15	periquito australiano
27- P9C5	manon / calafate	70- P3B16	periquito australiano
28- P10A5	manon / mandarim	71- P4A16	periquito australiano
29- P10B5	manon / canário	72- P10A16	star finch / diamante de gould
30- P10C5	star finch / diamante de gould	73- P10B16	canário
31- P10D5	canário	74- P10C16	manon / mandarim
32- P17B5	calafate / agapornis	75- P10D16	periquito australiano
33- P18B5	periquito australiano / agapornis	76- P13A16	calopsita / agapornis
34- P20B5	canário	77- P25C16	periquito australiano
35- P1C6	periquito australiano	78- P3A17	canário / periquito australiano
36- P9A7	canário	79- P3D17	pombo
37- P10C7	star finch / diamante de gould	80- P9B17	canário
38- P10C8	star finch / diamante de gould	81- P15B17	periquito australiano
39- P10D8	periquito australiano	82- P3C18	periquito australiano
40- P11A8	manon	83- P4A18	canário
41- P20B8	periquito australiano	84- P20F18	calopsita
42- P3A9	periquito australiano	85- P24D19	canário
43- P8A9	manon		

As amostras: P = “pet-shop”, seguido do número do mesmo, uma letra representando alfabeticamente a diferente amostra em uma mesma loja e por último o número do mês em ordem de coleta, sendo o n° 1= fevereiro de 2002 e o n° 19= agosto de 2003. Ex: P3C11 = “pet-shop” 3, amostra C e 11°mês.

Entre os “pet shops” analisados no trabalho, alguns demonstraram um elevado número de isolamentos em relação à média dos outros “pet shops”. O “pet shop” de número 10 (Méier) apresentou 35,06 % de positividade entre um total de 77 amostras coletadas, também apresentando a maior variedade de espécies com excretas positivas principalmente os

periquitos australianos, seguidos do canário belga, manon, mandarim, calopsita, agapornis, “star finch” e diamante gould. Este estabelecimento teve, também, o maior número de meses com isolamentos positivos, 11 de um total de 19 meses analisados.

O estabelecimento número 3 (Abolição) apresentou 31,91 % de positividade para o isolamento da levedura, de um total de 47 amostras coletadas e processadas. Neste estabelecimento, prevaleceram os isolamentos de excretas de periquito australiano principalmente, mas também de canário belga e pombo.

Os materiais usados no fundo das gaiolas variavam muito, na maioria das lojas, sendo o jornal (Figura 6), a opção mais usada, principalmente aquelas com baixo número de isolamentos. As lojas que tiveram mais isolamentos utilizavam areia (“pet shop” 10) (Figura 7) ou deixavam as fezes caírem diretamente sobre as chapas de metal do fundo (“pet shop” 3) (Figura 8). Esses tipos de cobertura dos fundos das gaiolas são difíceis de limpar totalmente e as fezes que não são retiradas ficam por muito tempo, possibilitando a colonização pelo *Cryptococcus neoformans*. Excretas de aves são ricas em creatinina, ácido úrico e outros componentes, facilmente assimilados pela levedura (Levitz, 1991), e estas dessecadas que ficam aderidas às gaiolas podem manter leveduras viáveis por anos, resistência mencionada por Litman & Borok (1968).

As amostras positivas foram coletadas de gaiolas com um número de animais muito variável, não se observando nenhuma correlação com um grande número de animais por gaiola, já que muitas das amostras foram provenientes de gaiolas com muitos poucos animais. Um exemplo é o “pet-shop” 3 que apresentou 4 animais por gaiola no máximo, mas com um grande número de amostras positivas.



Figura 6. Gaiola de periquitos australianos com fundo coberto por jornal, apresentando um grande acúmulo de excretas e restos de comida no “pet-shop” localizado em Madureira.



Figura 7. Gaiola de canários com fundo coberto de areia e acúmulo de excretas e restos alimentares no “pet-shop” n° 10 localizado no Méier, embutida a parede com apenas o fundo removível.



Figura 8. Gaiola de canários com fundo sem cobertura e um grande acúmulo de excretas aderidas à chapa de metal impossibilitando a limpeza adequada, no “pet-shop” n° 9 localizado em Madureira.

Um aspecto que deve ser refletido é o fato de que os estabelecimentos visitados em sua maioria, em nenhum momento expõem os animais nas gaiolas ao sol. As gaiolas permanecem em ambiente fechado praticamente todo o tempo. O fato de não exposição ao sol favorece o desenvolvimento de *Cryptococcus neoformans*. A temperatura em um ambiente exposto à luz solar, principalmente as chapas de metal usado no fundo das gaiolas podem atingir facilmente mais de 40°C, nas temperaturas do Rio de Janeiro. Ishaq et al (1968) observaram o não crescimento da levedura em ambientes com a temperatura maior que 40°C, ambientes estes expostos à luz solar.

Estes são ambientes, na sua maioria, com ventilação inadequada, o que facilita o dessecação das excretas, em temperaturas não muito altas, facilitando o desenvolvimento

dos microorganismos e a veiculação dos mesmos, que podem ser inalados pelos freqüentadores da loja e principalmente pelos funcionários, que vivem em contato constante com esse ambiente contaminado. A importância desses aerossóis é afirmada por muitos autores, que defendem que a via de infecção é pela inalação de leveduras dessecadas ou basidiósporos (Passoni et al 1998). Por outro lado é sabido que fatores que influenciam na presença de *Cryptococcus neoformans*, como a umidade, podem incrementar a sobrevivência e proliferação do fungo no solo. A falta de luz solar permite também temperaturas mais propícias para a levedura, segundo Levitz (1991) e Casadevall & Perfect (1998).

Um questionamento também importante na reprodução, de *Cryptococcus neoformans*, é quem são as partículas infecciosas. Caso a reprodução sexuada predomine no ambiente os basidiosporos podem ser inalados ou ingeridos levando a infecção humana, já que essas partículas medem de 1 a 2 µm, tamanho ideal para penetração alveolar (Cohen et al, 1982 ; Ellis & Pfeiffer, 1990). Predominando a reprodução assexuada as partículas infecciosas se resumiriam às células em forma de leveduras.

Muitos clientes dessas lojas compram seus pássaros, que são vendidos juntamente com a gaiola, principalmente os canários, carregando, neste caso, esse agente para dentro dos seus domicílios. A presença de *C. neoformans* em domicílios no Rio de Janeiro já foi evidenciada por Passoni et al (1998). Clientes estes que podem estar em contato direto com um indivíduo imunossuprimido e ou serem portadores de uma debilidade no sistema imunológico, servindo como fonte de infecção. A Criptococose no Brasil causada por *C. neoformans* var *grubii* tem elevada morbidade e mortalidade entre os portadores de HIV (Nishikawa et al, 2003).

Existe também a possibilidade dessas aves carregarem no trato digestivo a levedura para o domicilio dos compradores, como foi demonstrado por Litman & Borok (1965) com estudo envolvendo pombos, instilando a levedura por via oral e recuperando a levedura nas excretas, fato que pode ocorrer em outras espécies como as pesquisadas por nos neste estudo.

O “pet shop” de número 10, no período do trabalho utilizava no fundo de suas gaiolas, areia, onde os pássaros depositavam restos alimentares, principalmente sementes, e excretas. Também ocorria o umedecimento com água derramada dos bebedouros. Suas gaiolas são embutidas nas paredes, onde o acesso é difícil, o que dificulta a limpeza que é feita, apenas, 2 a 3 três vezes na semana, criando um ambiente propício para insetos, como as baratas. Swinne & Eyckmans (1984) isolaram *C. neoformans* do trato gastrointestinal de baratas, no Zaire, e também Swinne et al (1986) o fizeram. Tais fatos mostram-nos que existe a possibilidade de que estas baratas observadas, principalmente nesse estabelecimento, poderiam carrear o agente, para outras localidades.

Verificamos o isoladamente da *Cryptococcus neoformans* em várias aves, sendo a maior número de isolados obtidos das excretas de periquito australiano (Figura 9), fato explicado provavelmente pelo maior número dessa espécie de aves sendo comercializada nesses estabelecimentos. De um total de 271 amostras coletadas desta ave, 27 apresentaram-se positivas (Tabela 5). Amostras positivas para esta espécie já haviam sido demonstradas por Filii et al (2002). Sendo que em nosso estudo a percentagem de isolamentos foi bem menor (8,85%), o que se explica devido ao maior número de amostras analisadas por nós e em ambientes diferentes.



Figura 9. Gaiola de periquitos australianos com grande acúmulo de excretas e sementes sobre o fundo de jornal, também demonstrando uma grande quantidade de animais em um pequeno espaço, no “pet-shop” n° 17 localizado na Taquara.

Tabela 5. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excretas aviárias, relacionando as aves com o n° de amostras coletadas e as amostras positivas.

Espécies aviárias	Amostragem	N° de amostras positivas	Percentual de positividade
Periquito australiano	271	27	9,96
Canário	220	14	6,36
Pombo	18	4	22,22
Mandarim	54	1	1,85
Manon	55	3	5,45
Calopsita	139	2	1,44
Calafate	39	2	5,13
Agapornis	131	1	0,76
Rolinha diamante	12	1	8,33
Diamante de gould	25	0	0
Manon + mandarim	140	8	5,71
Diamante de gould + star finch	22	7	31,82
canário + periquito australiano	9	2	22,22
Calopsita + canário	3	1	33,33
agapornis + calopsita + periquito australiano	3	2	66,67
Manon + calafate	2	1	50,00
Periquito australiano + agapornis	6	1	16,67
Agapornis + calopsita + calafate	4	0	0,00
Manon + canário	3	1	33,33
canário + calafate + mandarim + manon	15	1	6,67
Calopsita + agapornis	46	4	8,70
calafate + agapornis	10	1	0
calafate + canário	25	1	0
canário + calafate + periquito australiano	16	0	0
Total	1268	85	6,70

Algumas espécies de aves como a *Nymphicus hollandicus* (calopsita), apresentaram poucos isolamentos da levedura (1,44%). Foram coletadas 139 amostras (Tabela 5) desta espécie, um número elevado de amostras em relação às demais coletas. No entanto, por serem aves maiores pertencentes ao grupo das cacatuas, que apresentam um valor de mercado maior e são mais atrativos, os proprietários das lojas tendem a deixar gaiolas sempre limpas, sem acúmulo de excretas. Além dos fatores sanitários, esses animais atualmente se alimentam muito mais de rações industrializadas, comparadas as outras aves por nós estudadas, e não mais apenas grãos, como o de girassol como ocorria há alguns anos atrás. Apenas amostras mistas desta espécie a outras se apresentaram positivas, como foi também relacionado por Filiu et al (2002). Abegg et al, 2006 isolaram também *C. neoformans* var *grubii* de excretas desta espécie no Rio Grande do Sul, Brasil.

O isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excretas de canário antes deste trabalho já havia sido relatado por diversos autores, como Swinne-Desgain (1975) e Levitz (1991). No nosso trabalho a percentagem de isolamento das excretas de canários foi de 6,6%. De um total de 220 amostras apenas 15 foram positivos. Criseo et al (1995) na Itália verificaram 29,6 % de isolamento desse agente em lojas de animais.

Muitas das amostras positivas foram provenientes de gaiolas que continham excretas de mais de uma ave (Tabela 5). Nos estabelecimentos que agrupavam, rotineiramente, diferentes espécies na mesma gaiola, foi observado que não havia preocupação com o acúmulo de excretas, por serem aves baratas e também pelas limitações de espaço. Por este motivo, havia grande volume de aves em gaiolas pequenas. Foram 304 amostras mistas sendo 30 positivas para *C. neoformans* (Tabela 5), com aves de espécies diferentes. Sendo que 7 amostras positivas de excretas de star finch e diamante de gould foram coletadas de gaiolas com poucos animais, pois são animais de maior valor de mercado (Figura 10).



Figura 10. Gaiolas superlotadas de canário e calafate com fundo coberto de jornal e grande acúmulo de excretas e sementes, localizadas no “pet-shop” n° 20, Campo Grande.

Das 85 amostras isoladas 28 amostras foram consideradas “inviáveis” após algumas tentativas de recuperação. Um número de 56 isolados até aqui foi conservado para a caracterização da sorogrupagem e da virulência “in vitro”. No entanto, 54 foram classificadas como sorogrupo AD e dois isolados como sorogrupo BC, sendo estes dois uma amostra isolada de material misto de canário belga com periquito australiano e outra de amostra mista de agapornis, calopsita e calafate.

As duas amostras de *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii*, P9A4 (canário + periquito australiano) e P9B4 (agapornis + calopsita) (Tabela 4), foram coletadas no estabelecimento número 9 (Madureira) situado em construção completamente fechada, sem contato com a luz solar e por onde circulam milhares de pessoas por dia, tendo contato com comércio de produtos de diversos tipos desde comidas, produtos para chás (folhas, raízes, cascas de plantas), brinquedos, até roupas. Esta é uma condição preocupante, considerando se tratar de uma localização em um típico “Mercado Popular”. Neste caso além de um ambiente propício ao desenvolvimento do agente há um maior risco dos frequentadores que passam a ser, não somente os compradores dos “pet shops”, mas também as pessoas interessadas em outros tipos de produtos.

Nosso trabalho demonstra dados condizentes à literatura, onde, de excretas aviárias o sorogrupo AD (Baroni, 2001; Filii et al 2003) é o mais isolado em comparação ao sorogrupo BC que é mais isolado de solos e de ocas de árvores (Lazera et al 1993 ; Lazera et al 1998).

Sendo a variedade *grubii* sorotipo A mais relacionada as excretas de aves cativas de diversas espécies, seguida pelo sorotipo B da variedade *gattii* (Abegg et al, 2006).

Com este trabalho, esperamos estar contribuindo ao mostrarmos a importância destas novas fontes, pois a criptococose por sorogrupo AD predomina em pacientes imunossuprimidos, principalmente portadores de HIV, em todo o Brasil (Pappalardo & Melhem, 2004).

4.2 – Virulência “*in vitro*”:

Todas as 56 amostras analisadas demonstraram-se produtoras de protease e de fosfolipase. Deste total evidenciaram-se 57,12% fortes produtoras de fosfolipase (Pz=3) e 96% também fortemente produtoras de protease (Pz=3) (Tabela 6). Mesmo considerando-se que os fatores de virulência atuam conjuntamente, estes resultados levam-nos a considerar que podemos estar diante de isolados com grande potencial patogênico, que podem entrar em contato com indivíduos imunossuprimidos, frequentadores dessas lojas.

A fosfolipase facilita a ação da levedura no sistema nervoso e no pulmão (Kurtzman & Fell, 1998). Trabalhos recentes mostram que esta enzima também facilita a aderência das células de *C. neoformans* ao epitélio pulmonar, por agir sobre substratos do hospedeiro e liberarem ácidos graxos, que atuam indiretamente facilitando a aderência ao tecido (Ganendren et al, 2006).

De qualquer modo, foi ressaltado por vários trabalhos que cepas não produtoras de protease podem tornar-se produtoras quando inoculadas em vivo e depois novamente testadas (Baroni, 2001; Gonçalves da Silva et al, 2004; Gonçalves da Silva et al, 2006), mostrando que nossos isolados, por já serem produtores de protease, devem ser avaliados em futuras etapas para avaliar melhor a sua patogenicidade.

Nossos dados de fosfolipase são concordantes com os de literatura, onde, grande parte dos isolados de *C. neoformans* apresentou produção de fosfolipase, sendo a maioria código de Pz 2 e uma grande parte código 3 (fortemente produtoras). Também com uma variação de Pz bem diferenciada, podendo estar relacionada à virulência do isolado e a capacidade de invasão de tecidos (Vidotto et al 1996).

Vidotto et al (2005) utiliza uma forma de classificação diferente do nosso trabalho, classificando a produção de fosfolipase e protease em três grupos, de acordo com os valores de Pz diferentes aos usados por nós e por Vidotto et al 1996. Amostras com Pz alto (1,00-0,70), com Pz moderado (0,699-0,40) e Pz baixo (0,399-0,00), sendo fracos produtores, médio produtores e fortes produtores respectivamente. No nosso trabalho classificamos de acordo com a Tabela 1 já demonstrada, considerando todos os isolado com Pz inferior a 0,64 fortemente produtores. Ao fazer essa comparação percebemos que ao usar os valores de Pz, independentemente da classificação, que os dados de ambos os estudos são concordantes.

Os isolados demonstraram um valor inferior a 0,64 de Pz quanto à produção de protease, sendo classificados por nesse trabalho como fortemente positivo. Valores semelhantes ao observado nas cepas estudadas por Vidotto et al (2006), mostrando neste trabalho uma semelhança entre as cepas de excretas aviárias e as cepas de pacientes portadores de HIV, quanto à produção de fosfolipase e protease.

Vidotto et al (2006) também chamam atenção para o tempo e a temperatura de incubação, mostrando que há uma grande variação dos valores de Pz, tanto na avaliação da fosfolipase e da protease, entre o 4º dia de incubação e o 8º dia de incubação à 37°C. Neste estudo utilizamos à temperatura de incubação de 32°C e as leituras foram feitas, como descrito no material e métodos, sendo o 10º dia o período de maiores valores de Pz permanecendo estáveis nos dias posteriores.

Tabela 6. Produção de fosfolipase por *Cryptococcus neoformans* isolados de “pet shops” do Município do Rio de Janeiro-RJ e respectivos valores de Pz segundo Price et al (1982).

FOSFOLIPASE							
Amostra	Dc (cm)	Dcp (cm)	Pz	Amostra	Dc (cm)	Dcp (cm)	Pz
P1C6	0,8	1,9	0,42	P10B10	1	1,5	0,67
P3A3	0,9	1,8	0,50	P10B11	1,1	1,7	0,65
P3A5	0,9	1,2	0,75	P10B14	0,9	1,5	0,60
P3A9	0,9	2,5	0,36	P10C3	1	1,7	0,59
P3A10	1	1,8	0,56	P10C5	0,9	2	0,45
P3B3	0,8	1,6	0,50	P10C7	0,8	2	0,40
P3B5	0,9	1,5	0,60	P10C8	0,9	2	0,45
P3C18	0,9	1,5	0,60	P10C10	0,8	1,4	0,57
P3C2	1,2	2	0,60	P10C14	0,8	2,2	0,36
P3C11	0,9	1,5	0,60	P10C16	1	1,5	0,67
P6A5	1	2	0,50	P10D5	1	1,5	0,67
P6B4	1,1	2	0,55	P10D8	1,15	2	0,58
P8A9	1	1,5	0,67	P10D10	1,2	1,8	0,67
P8C11	0,7	0,8	0,88	P10D11	1	2,2	0,45
P8D5	1	1,7	0,59	P10D14	0,8	1,1	0,73
P9A5	0,8	1,3	0,62	P10E10	1	1,6	0,63
P9A4	1	3,5	0,29	P11A8	1,1	1,4	0,79
P9A7	1,5	2,3	0,65	P11B11	1,2	2,2	0,55
P9A10	1,2	1,8	0,67	P15A4	0,8	1,2	0,67
P9B4	1	1,3	0,77	P15C4	1	2,7	0,37
P9B11	1	1,5	0,67	P16B4	1,1	2	0,55
P9C5	1	2,3	0,43	P17A9	1,2	2,5	0,48
P9C14	1,4	2,2	0,64	P17B5	0,9	1,5	0,60
P10A5	0,8	1,3	0,62	P17B11	1,3	1,7	0,76
P10A9	1,7	2,2	0,77	P18B5	1,1	1,6	0,69
P10A10	0,9	1,7	0,53	P20B3	1	1,5	0,67
P10B5	0,7	0,9	0,78	P20B5	0,9	1,2	0,75
P10B9	1	1,7	0,59	P20D11	1,3	3	0,43

Dc = diâmetro da colônia em cm, Dcp = diâmetro da colônia somado ao halo de precipitação, Pz= relação Dc/Dcp. As amostras: P = “pet shop”, seguido do número do mesmo, uma letra representando alfabeticamente a diferente amostra em uma mesma loja e por último o número do mês em ordem de coleta. Ex. P3C11 = “pet shop” 3, amostra C e 11º mês.

Tabela 7 . Produção de protease por *Cryptococcus neoformans* isolados de “pet shops” do Município do Rio de Janeiro-RJ e respectivos valores de Pz segundo Price et al (1982).

PROTEASE							
Amostra	Dc (cm)	Dcp (cm)	Pz	Amostra	Dc (cm)	Dcp (cm)	Pz
P1C6	0,55	1	0,55	P10B10	0,5	0,75	0,67
P3A3	1,4	2,7	0,52	P10B11	0,6	1,6	0,38
P3A5	1,1	3	0,37	P10B14	0,55	1,45	0,38
P3A9	0,8	3	0,27	P10C3	0,9	2	0,45
P3A10	1,3	2,6	0,50	P10C5	0,5	1,3	0,38
P3B3	0,5	1,1	0,45	P10C7	1,2	2,2	0,55
P3B5	1,1	3	0,37	P10C8	0,5	1,7	0,29
P3C18	0,5	0,8	0,63	P10C10	0,6	0,8	0,75
P3C2	1	2,3	0,43	P10C14	0,6	0,85	0,71
P3C11	1,3	3	0,43	P10C16	1,2	2,4	0,50
P6A5	1,1	2	0,55	P10D5	1,2	3	0,40
P6B4	1,1	2,5	0,44	P10D8	0,5	0,9	0,56
P8A9	0,55	1,5	0,37	P10D10	1,4	2,5	0,56
P8C11	0,6	1,2	0,50	P10D11	0,55	1	0,55
P8D5	1,3	2,5	0,52	P10D14	0,65	1	0,65
P9A5	0,5	1	0,50	P10E10	0,5	0,8	0,63
P9A4	0,45	1,25	0,36	P11A8	1,1	2,6	0,42
P9A7	1,1	3,5	0,31	P11B11	1,1	3	0,37
P9A10	0,5	1,4	0,36	P15A4	1,1	2,4	0,46
P9B4	0,3	0,8	0,38	P15C4	1,1	2	0,55
P9B11	0,55	2	0,28	P16B4	1,2	2,7	0,44
P9C5	1,4	2,3	0,61	P17A9	0,55	1,5	0,37
P9C14	0,7	1,5	0,47	P17B5	0,6	2,5	0,24
P10A5	0,55	0,8	0,69	P17B11	1,4	2,3	0,61
P10A9	0,7	1,1	0,64	P18B5	1,2	2,5	0,48
P10A10	0,45	1	0,45	P20B3	2,2	2,5	0,88
P10B5	0,75	1,1	0,68	P20B5	1,3	2,4	0,54
P10B9	1,1	3,3	0,33	P20D11	0,55	0,9	0,61

Dc = diâmetro da colônia em cm, Dcp = diâmetro da colônia somado ao halo de precipitação, Pz= relação Dc/Dcp. As amostras: P = “pet shop”, seguido do número do mesmo, uma letra representando alfabeticamente a diferente amostra em uma mesma loja e por último o número do mês em ordem de coleta. Ex. P3C11 = “pet shop” 3, amostra C e 11º mês.

De 56 isolados de *Cryptococcus neoformans* analisados, todos se encaixaram nos biótipos “Killer” I e II característicos da variedade *neoformans*, como mostra a tabela 7. Neste estudo mais de 22,23% foram classificadas como pertencentes do biótipo II e 77,77% do biótipo I. Boekhout & Scorzetti (1997) a partir 122 cepas de *C. neoformans* var *neoformans* e 32 cepas da var *gattii* determinou os padrões de biotipagem “Killer”. Os isolados P9A4 e P9B4 positivos ao CGB na avaliação “Killer” demonstraram-se pertencentes ao biótipo I, dados este discordante da técnica, onde cepas sorogrupadas como BC foram classificadas como variedade *neoformans*. Fato que deve ter ocorrido devido a técnica que foi desenvolvida por Boekhout & Scorzetti, 1997, que utilizaram poucas cepas de *C. neoformans*

variedade *gatti*, mesmo assim encontrando vários biótipos, levando-nos a considerar que existem outros biótipos não classificados por eles em seu estudo.

Tabela 8. Comparação dos biótipos “Killer” encontrados nas amostras de *C. neoformans* isolados de “pet-shops” . (Boekhout & Scorzetti, 1997).

Produção da toxina "Killer"							
Amostra	Biotipo	Amostra	Biotipo	Amostra	Biotipo	Amostra	Biótipo
P1C6	II	P8D5	I	P10B10	II	P10D14	I
P3A3	I	P9A5	I	P10B11	I	P10E10	II
P3A5	II	P9A4	I	P10B14	I	P11A8	II
P3A9	I	P9A7	I	P10C3	II	P11B11	I
P3A10	I	P9A10	I	P10C5	II	P15A4	I
P3B3	II	P9B4	I	P10C7	II	P15C4	I
P3B5	I	P9B11	I	P10C8	I	P16B4	I
P3C18	I	P9C5	I	P10C10	I	P17A9	I
P3C2	I	P9C14	I	P10C14	I	P17B5	I
P3C11	II	P10A5	I	P10C16	I	P17B11	I
P6A5	I	P10A9	I	P10D5	II	P18B5	I
P6B4	I	P10A10	I	P10D8	I	P20B3	I
P8A9	I	P10B5	I	P10D10	II	P20B5	I
P8C11	I	P10B9	I	P10D11	I	P20D11	I

As amostras: P = “pet shop”, seguido do número do mesmo, uma letra representando alfabeticamente a diferente amostra em uma mesma loja e por último o número do mês em ordem de coleta. Ex. P3C11 = “pet shop” 3, amostra C e 11ºmês. N. R.= não realizado.

5. CONCLUSÕES

- Além das excretas de pombos as excretas de muitas outras aves são fontes de *C. neoformans*.
- Os fundos das gaiolas cobertas com areia, plástico ou nenhuma cobertura dos fundos, dificultavam a limpeza propiciando a proliferação da levedura.
- Excretas de periquito australiano, canário, mandarim, manon, calopsita, calafate, rolinha diamante, agapornis, pombo, diamante de gould e star finch, são fontes de *C. neoformans* variedade *neoformans*, no município do Rio de Janeiro.
- *C. neoformans* pode ser isolado em grande parte de estabelecimentos destinados ao comércio de aves do município do Rio de Janeiro, com isolados das zonas norte, sul, oeste da cidade.
- Estabelecimentos que possuem grandes quantidades de aves, com limpeza inadequada, com acúmulo de grandes quantidades de excretas e muito fechados, apresentaram os maiores números de isolamentos.
- Comerciantes e freqüentadores de lojas de animais estão freqüentemente em contato com *C. neoformans* variedade *neoformans*.
- A maior parte das amostras de origem mista (duas ou mais aves), mostram-se positivas comparadas as de espécies separadas, com percentuais variando de 5% a 31,82%.
- As lojas com o maior acúmulo de excretas são fontes contínuas da presença da levedura.
- Os isolados demonstraram-se fortes produtores de fosfolipase e de protease, independente do ponto de origem das amostras.
- Os valores de Pz obtidos pela produção de fosfolipase e protease foram semelhantes aos de cepas isoladas de portadores de HIV.
- Para dois isolados identificados como pertencentes à variedade *gattii* (sorogrupo BC), a biotipagem “Killer” foi discordante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AJELLO, L. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soil. **Am.J.Hyg.** n. 67, p. 72-77, 1958 – Apud DROUHET, E. Milestones in the History of *Cryptococcus* and cryptococcosis. **J. Mycol. Med.** v.7, p. 10-27, 1997.

AOKI, S. ; ITO-KUWA, S. ; NAKAMURA, K. ; KATO, J. ; NINOMIYA, K. & VIDOTTO, V. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans* **Mycopathologia**. v.128, p. 143-150, 1994.

BAWENS, L. ; SWINNE, D.; De VROEY, C. & MEURICHY, D. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. **Mykosen**. v. 29, p.292-294, 1986.

BARONI, F.A. **Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em torres de Igreja na cidade do Rio de Janeiro: Fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos.** 2001. 232f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) Inst. De Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BARONI, F. de A. ; PEREIRA, J. R. ; CAMPOS, F. L. ; DELEITO, C. S. ; SCHERER, R. R. ; CAMPOS, S.G. ; DIREITO, G. M. Presença de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos localizadas em torre de igreja da cidade de Manaus – AM. **Anais do XXXI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, São Luiz – MA, 2004.

BARONI, F.A.; PAULA, C.R.; GONÇALVES DA SILVA, E; VIANI, F.L.; RIVERA, I.N.G.; BARRETO DE OLIVEIRA, M.T.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**. v. 48, n.2, p. 71-75, 2006.

BENNETT, J. E. ; KWON-CHUNG, K. J. & HAWARD, D. H. Epidemiologic Differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. **Am. J. Epidemiol.** v.105, p. 582 –586, 1977.

BIBAS, P. ; VAN-VOOREN, J. P. ; SCHAKAL, A. ; DEWORME, A. ; DARGENT, J. L. & ZANEN, A. Cryptococcal chorioretinitis and acquired Immunodeficiency syndrome : apropos of case. **Bull. Soc. Belge Ophtalmol.** v. 250, p. 67-76, 1993.

BLANCHARD, P. C. & FILKINS, M. Cryptococcal pneumonia and abortion in a equine fetus. **J. American Veter. Med. Association.** v.201, p.1591 -1592,1992.

BOEKHOUT & SCORZETTI. Differential Killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. **J. Med. Vet. Mycol**, v.35, p.147-149, 1997.

- BONACINI, M. ; NUSSBAUM, J. & AHLUWALIA, C. Gastrointestinal , hepatic and pancreatic involvement with *Cryptococcus neoformans* in AIDS. **J. Clin. Gastroenterol.** v.12, p. 296 –297, 1990.
- BRUESKE, C.H. Proteolytic activity of a clinical Isolate of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.** v.23, p. 631-633, 1986.
- BUCHANAN, K. L. & MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen ? **Emerging Infectious Diseases.** v.5, n. 1, 1998.
- BUSSE, O. Uber parasitare zelleinschlusse und ihre zunchtung. **Zentralbl. Bakteriol.** N. 16, p. 175-180, 1894. – Apud MITCHELL, T.G. & PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the Era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiology Rewies.** v.8, p. 515-548, 1995.
- CASADEVALL, A. & PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans* . Washinton ASM Press, 1998, 541 f.
- CASADEVALL , A. ; FREUNDLICH , L . ; MARSH , L . & SCHARFF , M. D . Extensive allelic variation in *Cryptococcus neoformans* . **J. Clin. Microbiol.** v. 30, p. 1080-1084 , 1992.
- CHAGAS, W.A.; FIGUEIREDO, J.B.; CRUZ, L.C.H.; NEVES, J.G. Criptococose cutânea em gato doméstico, descrição de um caso. **R. Brás. Med. Vet.** v.1, p.5-12, 1971.
- CHAKRABORTY, T.; BASAK, D. K.; BHOWMIK , M. K . & MAZUMDER , B . Isolation of *Cryptococcus neoformans* from captive birds . **Indian. Vet. J.** v.68, p. 517-520 , 1991.
- CHANDNA, V. K.; MORRIS, E.; GLIATTO, J. M. & PARADIS, M. R. Localised Subcutaneous cryptococcal granuloma in a horse. **Equine Veterinary Journal.**, 1993.
- CHANG , Y. C . & KWON-CHUNG , K . J. . Complementation of a capsule-Deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol.Cell. Biol** .v.14, p. 4912-4919 , 1994.
- CHAPMAN , H. M. ; ROBINSON, W. F. ; BOLTON, J.R. & ROBERTSON, J. P. *Cryptococcus neoformans* in goats . **Austr. Veter. J.** v.67, p. 263-265 , 1990.
- CHEN, L. C. ; BLANK, E. S . & CASADEVALL , A . Extracellular proteinase Activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.3, p.570-574, 1996.
- CHEN, S . C . ; WRIGHT , L . C . ; SANTANGELO , R . T . ; MULLER , M . ; MORAN, V. R. ; KUCHEL , P. W. & SORRELL , T. C. Identification of Extracellular phospholipase B , lysophospholipase and acyltransferase Produced by *Cryptococcus neoformans* . **Infect. Immun.** v.65, p.405-411, 1997.

- CHEN, S. C. ; MULLER , M. ; ZHON, J. Z. ; WRIGHT , L. C. & SORRELL , T. C. Phospholypase activity in *Cryptococcus neoformans* : a new virulence factor ? **J. Infect. Dis.** v.175, p. 414-420 , 1997.
- CHIESA, S.C. Criptococose felina : Aspectos clínicos – Epidemiológicos. **Dissertação** (Mestrado). São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP. 94 p. 1998.
- COHEN , J. ; PERFECT, J. R. & DURACK , D. T. Cryptococcosis and the Basidiospore . **Lancet**, v.1, p. 1501 , 1982.
- CORAZZA, M. ; MANCIANTI, F. ; BIZZETI, M. ; BUONACORSI, A. Canine cryptococcosis: case report. **Objettivi Documenti Veterinari**, 1991.
- COSTA CORRÊA, M. P. S. ; OLIVEIRA, E. C. ; SEIXAS DUARTE , R. R. B. ; PARDAL, P. P. O. ; OLIVEIRA, F. de M. & SEVERO, L. C. Criptococose em crianças no Estado do Pará , Brasil . **Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.** v.32, p. 505-508 , 1999.
- COX, G. M. ; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A. & PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infect. Immun.** v.68, n. 2, p. 443-448 , 2000.
- CRISEO, G. ; BOLIGNANO, M.S. ; DE LEO, F. & STAIB, F. Evidence of Canary Droppings as na Important Reservoir of *Cryptococcus neoformans*. **Zeutrabl. Bakteriol.**, v.282, p.244-254, 1995.
- CRISEO, G. ; GALLO, M. & PERNICE, A. Killer activity at different pHs against *Cryptococcus neoformans* serotype A by environmental yeast isolates. **Zeutrabl. Bakteriol**, v. 42, p.600-608, 1999.
- CRISSEY, J.T. ; LANGH. ; PARISH, L.C. **Man. of Med. Mycology**, Blackwell Science, Spain, 1995.
- CRUMP , J. R. . ; ELNER , S. G. ; ELNER , V. M. & KAUFFMAN , C. A . Cryptococcal endophthalmitis : case report and review . **Clin. Infect. Dis.** v.14, p. 1069 – 1073 , 1992.
- CURTIS, F. Contribution à l'éétude de la saccaromyose humaine. **Ann. Inst. Pasteur** n.10, p.449-468, 1896. Apud – DROUHET, E. Milestones in the history of *Cryptococcus* and Cryptococcosis. **J. Mycol. Méd.** v.7, p.21-26, 2000.
- DARZÉ, C. ; LUCENA, R. ; GOMES, I. & MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Revista Soc. Bras. de Med. Trop.** v.33, p.21-26 , 2000.
- DENNING, D. W. ; ARMSTRONG, R. W.; LEWIS, B. H. & STEVENS , D. A. Elevated cerebrospinal fluid pressures in patients with cryptococcal meningitis And acquired immunodeficiency syndrome. **Am. J. Med.** v. 91, p. 267 – 272,1991.

DROMER, F.; RONIN, O. & DUPONT, B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from an Asian patient in France : evidence for dormant infection in healthy subjects . **J. Med. Vet. Mycol.** v. 30, p. 395-397 , 1992.

DROMER, F. ; VARMA, A. ; RONIN, O. ; MATHOULIN, S. & DUPONT, B. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* serotype D clinical isolates . **J. Clin. Microbiol.** v.32, p. 2364-2371 , 1994.

DROMER, F. ; MOULIGNIER, A. ; DUPONT, B. ; GUEHO, E. ; BAUDRIMONT, M. ; IMPROVISI, L. ; PROVOST, F. & GONZALES - CAVALI, G. Myeloradiculitis due to *Cryptococcus curvatus* in AIDS. **AIDS.** v. 9, p.395– 396 , 1995.

DROUHET, E. Milestones in the history of *Cryptococcus* and cryptococcosis . **J. Mycol. Méd.** v.7, p.10-27 , 1997.

DUARTE, R.A. ; ORDOÑES, N. & CASTAÑEDA, E. Associação de leveduras De gênero *Cryptococcus* com espécies de *Eucalyptus* em Santafé de Bogotá. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.36, p.125-130, 1994.

ELLIS, D. H. *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in Australia . **J. Clin. Microbiol.** v. 25, p.430-431 , 1987 .

ELLIS, D.H. & HOWARD, D.H. Virulence serotype and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p. 1642-1644, 1992.

ELLIS, D. H. & PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* . **J. Clin. Microbiol.** v.28, p.1642-1644 , 1990.

El Manual Merck de Veterinaria . Rahway , New Jersey , USA, Merck & Co., Inc. , p. 369-370, 1981.

EL-SERGANY, M.A.; SOUFY, H.; LOTFÚ, M.M.; HASSANAIN, M.A.; NASSAR, A.R.; MOHAMED, L.A.; SHASH, S. Lymphadenitis in Egyptian camels with special reference to bacteriological and parasitological affections. **Egyptian Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology.** v.4, p. 25-45, 1991.

ENSLEY, P. K. ; DAVIS, C. E. ; ANDERSON, M. P. & ELETCHER, K. C. & FLETCHER, K. C. Cryptococcosis in a male Beccari's crowned pigeon. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.175, p. 992-994 , 1979.

ERGIN, Ç.; ILKIT, M.; HILMLOGLU, S.; KALELI, I.; GULBABA, A.G.; DERMIRCI, M.; KAYA, S. The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from *Eucalyptus* trees in South Aegean and Mediterranean Regions of Anatolia in Turkey despite Taurus Mountains alkalinity. **Mycopathologia.** v. 158, p. 43-47, 2004.

EVANS, E.E. An immunologic comparison of twelve strains of *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*). **Proc. Soc. Exp. Biol.** (NY). v. 71, p.6444-6446, 1949. Apud DROUHET, E. Milestones in the history of *Cryptococcus* and cryptococcosis. **J. Mycol. Méd.** v.7, p.10-27, 1997.

FAGGI, E. ; GARGANI, G. ; PIZZIRANI, C. ; PIZZIRANI, S. & SAPONETTO, N. Cryptococcosis in domestic mammals . **Mycoses** . v.36, p.5-6 , 1993.

FELL, J. W. ; KURTZMAN , C. P. & KWON-CHUNG, K. J. Proposal to conserve *Cryptococcus* . **Taxon**. v.38, p.151-152 , 1989 .

FERNANDES, O . de F. L. ; COSTA, T. R. ; COSTA , M. R. ; SOARES, A. J. ; PEREIRA, A. J. S. C. & SILVA , M. R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. **Revista da Sociedade Bras. de Med. Tropical** .v.33, p.75-78 , 2000.

FERRER, L. ; ROMAS, J. A. ; BONAVIA, R. ; CABANES, J. & PUMAROLA, M. Cryptococcosis in two cats seropositive for feline immunodeficiency virus. **Veterinary Record** . v.131, p.393-394 , 1992.

FILIU, W.F.O. ; WANKE, B. ; AGUENA, S.M. ; VILELA, V.O.; MACEDO, R.C.L. ; LAZERA, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop.**. v. 35, n.6, p.591-595, 2002.

FRANZOT, S. P. ; SALKIN, I. F. & CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var *grubii* : Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J. Clin. Microbiol.** v.37, p.838 – 840 , 1999.

FREEMAN, 1931. Apud CASADEVALL, A. & PERFECT , J.R. *Cryptococcus neoformans*. washington, **ASM Press**, 1998, 541 p.

FRIEDMAN, G.D.; BRENSKI, A. & TAYLOR, L. Treatment of aphthous ulcers in AIDS patients. **Laryngoscope**. v. 104, p. 566-570, 1994.

FROMTLING , R. A. ; SHADOMU , H. J. & JACOBSON, E. S . Decreased virulence in stable , acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans* . **Mycopathol.** v.79, p.23-29 , 1982.

GARCIA – HERMOSO, D. ; JANBON, G. & DROMER, F. **Epidemiological Evidence for dormant infection due to *Cryptococcus neoformans*** .In : International Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis , Abstracts , p. 92 , 1999.

GARNER, F. M. ; FORD, D. F. ; ROSS, M. A . Systemic cryptococcosis in two monkeys . **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.7, p.1163-1168 , 1969.

GATTI, F. & FECKELS, H. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin . Part I . Description of the disease and of the strain . **Ann . Soc. Belg . Med . Trop.** v.50, p. 689-694 , 1970 .

GLUCK , J. L. . ; MYERS , J. P. & PASS , L. M. Cryptococemia due to *Cryptococcus albidus* . **South. Med. J.** v. 80, p. 511-513 , 1987 .

GONÇALVES DA SILVA,E., BARONI, F.A., AULER, M.E., GANDRA, R.F., CRUZ, M.V.N., RUIZ, L.S., MATSUMOTO, F.E., CURY, A.E., RIVERA, I.N.G., GAMBALE, W., PAULA, C.R. Produção de proteinase e sensibilidade a fluconazol em *C. neoformans*: novo parâmetro a ser investigado. **Anais IV Congresso de Brasileiro de Micologia**, Ouro Preto, Minas Gerais, p. 144, 2004.

GONÇALVES DA SILVA,E., BARONI, F.A., VIANI, F.C.; RUIZ, L.S., GANDRA, R.F., AULER, M.E., GAMBALE, W., PAULA, C.R. Virulence profile of strains of *Cryptococcus neoformans* var. *grubbi* evaluated by experimental infection in Balb/c mice and correlation with a exoenzyme activity. **J. Med. Microbiol** . v. 55, p. 139-142, 2006.

GOMES, N. G. L. ; BONI, M. & PRIMO, C. C . The invasive behaviour of of *Cryptococcus neoformans* : a possibility of direct access to the central nervous system . **Mycopathol** . v.140, p.1-11, 1997 .

HSU, M. M. ; CHANG , C. ; YOKOYAMA, K. ; NISHIMURA , K. & MIYAJI, M. Serotypes and mating types of clinical strains of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan . **Mycopathol**. v.125, p. 77-81 , 1994 .

HUBALEK, Z. . Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a pigeon habitat . **Folia Parasitol** . v.22, p.73-79 , 1975.

IKEDA , R. & JACOBSON , E. S . Heterogeneity of phenol oxidases in In *Cryptococcus neoformans* . **Infect . Immunl**. v.60, p.3552 – 3555, 1992.

IROKANULO, E. O . A. ; MAKINDE, A. A. ; AKUESGI, C. O. ; EKWONU , M. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* isolated from droppings of captive birds in Nigeria . **J. Wildlife Dis**. v.33, p.343-345 , 1997.

ISHAQ, C.M. ; BULMER, G.S.; FELTON, F.G. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, v.35, p. 81-90, 1968.

JACOBS, D. H. ; MACHER, A. M. ; HANDLER, R. & BENNETT, J. E. ; COLLEN, M. J. & GALLIN , J. I . Esophageal cryptococcosis in a patient with the hyperimmunoglobulin E – recurrent infection (Job's) syndrome . **Gastroenterology** . v.87, p. 201-203 , 1984.

JACOBSON, E. S. & EMERY , H. S. Temperature regulation of the cryptococcal phenoloxidase . **J. Med. Vet. Mycol**. v. 29, p.121 – 124 , 1991 .

JACOBSON, E. S. & TINNELL . Antioxidant function of fungal melanin . **Journal of Bacteriology** . v.175, p.7102 – 7104 , 1993 .

KOBAYASHI, C.C.B.; SOUZA, L.K.H.; FERNANDES, O. de F.L.; BRITO, S.C.A. de; SILVA, A.C.; SOUSA, E.D. de; SILVA, M. do R.R. Characterization de *Cryptococcus neoformans* isolated from urban enviromental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. v. 47, n. 4, 2005.

KOVACS, J.; KOVACS, A.A. ; POLIS, M; WRIGHT, W.C.; GILL, V.J.; TUAZON, C.U. ; GELMAN, J.E.; LANE, H.C.Ç LONFIELD, R. ; OVERTURE, G. ; MACHER, A.M.; FAUCI, A.S.;PARRILLO, J.E.; BENNETT, J.E.; MASUR, H. Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann. Intern. Med**, v.103, p.533-538, 1985.

KOZEL,T.R.; HERMERATH, C.A. Binding of cryptococcal polysaccharide to *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.** , v.43, p. 879-886, 1984.

KREGER-van Rij, N.J.W.T. **The yeasts: a taxonomy study**. 3ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, 1984, 1082p.

KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. **The yeasts: a taxonomy study**, 4.ed, New York, 1998. 1055p.

KUTZING, F.T. Ssystematische Zusammenstellung der niedern Algen-Guttungen und Arten. Linnae . n. 8, p.365, 1833. Apud DROUHET, E. Milestones in the History of *Cryptococcus* and Cryptococcosis. **J. Mycol. Med.** v.7, p. 10-27, 1997.

KWON-CHUNG, K.J. A new genus, *Filobasidiella*, The perfect state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**. v. 68, p. 1197-1201, 1975.

KWON-CHUNG, K.J. A new species of *Filobasidiella*, The sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. **Mycologia**. v.68, p.943-946, 1976.

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) . **J. Clin. Microbiol.** v.15, p. 535-7 , 1982 .

KWON-CHUNG, K. J. ; POLACHECK , I. ; POPKIN , T. J. Melanin - lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice . **J. Bacteriol.** v.150, p.1414-1421 , 1982.

KWON-CHUNG , K. J. ; WICKES, B. L. ; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D. ; ELLIS, D. H. & HOWARD , D. H. Virulence serotype and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* . **Infect. Immun.** v. 60, p.1869 – 1874 , 1992 .

LACAZ, C. S. & RODRIGUES, M. C. Sorotipagem de *Cryptococcus neoformans*. **Ver. Bras. Med.** v. 40, p. 293 – 300 , 1983 .

LAZERA, M. S. ; WANKE, B. ; NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the City of Rio de Janeiro , Brazil . **J. Med. Vet. Mycol.** v.3, p. 449 – 454 , 1993 .

LAZERA , M. S. ; CAVALCANTI , M. A . S. ; TRILLES , L . ; NISHIKAWA , M . M. ; WANKE , B. *Cryptococcus neoformans* var *gattii* – evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Med. Mycol.** v.36, p.119 – 122 , 1998 .

LAZERA, M.S.; WANKE, B. & NISHIKAWA, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 31, p. 449-456, 1995.

LEGGIADRO, R.J. ; BARRET, F.F.; HUGUES, W.T. Extrapulmonary Cryptococcosis in immunocompromised infants and children. **Pediatr. Infec. Dis. J.** v.11, p.1163-1169, 1991.

LEVITZ, S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis . **RID.** v. 1, p. 1163 – 1169 , 1991 .

LI, A . ; NISHIMURA, K . ; TAGUCHI, H.; TANAKA, R. ; WU, S.; MIYAJI, M . The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinically sourced isolates in China. **Mycopathol.** v.124, p.1 – 5 , 1993 .

LI, A . ; GUO, N. & WU, S. A strain of urease negative *Cryptococcus neoformans* isolated from the environment in China . **Chin. Med. Sci . J.** v. 8, p. 52-4 , 1993.

LICHTENSTEIGER , C. A . & HILF , L. E. Atypical cryptococcal lymphadenitis in a dog . **Veterinary Pathology** . v.31, p. 493 – 496 , 1994 .

LITMAN, M.L. ; BOROK. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathol. Mycol. Appl.** v.35, p. 329-345, 1968.

LOPES - MARTINEZ , R . & CASTANON – OLIVARES, L . R . Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* from bird droppings , fruits and vegetables in Mexico City . **Mycopathol.** v. 129, p. 25 – 28 , 1995 .

MACHADO, C. C . ; AMARAL , A. A . & SEVERO, L. C. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* isolado do solo. **Rev . Inst. Med. Trop. São Paulo.** v. 35, p. 77 – 79 , 1993.

MALIK, R. ; WIGNEY , D. I. ; MUIR, D. B. ; GREGORY, D. J. & LOVE, D. N. Cryptococcosis in cats : clinical and mycological assessment of 29 cases and evaluation of treatment using orally administered fluconazole. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 30, p. 133 –144 , 1992 .

MALIK, R.; KROCKENBERGER, M.B.; CROSS, G.; DONELY, R.; MADIL, D.N.; BLACK, D.; MC WHIRTER, P.; ROZENWAX, A.; ROSE, K.; ALLEY, M.; FORSHAW, D.; RUSSEL-BROWN, I.; JOHNSTONE, A.C.; MARTIN, P.; O'BRIEN, C.R.; LOVE, D.N. Avian Cryptococcosis. **Med. Mycol.** v. 41, n. 2, p. 115-124, 2003.

MANCIANTI, F. ; GIANELLI, C. ; BENDINELLI, M. & POLI, A . Mycological Findings in feline immunodeficiency virus infected cats. **J. Med. Vet. Mycol.** v.30, p. 257 – 259 , 1992 .

McNAMARA, T. S. ; COOK, R. A. ; BEHLER, J. L. ; AJELLO, L. & PADHYE, A. A. Cryptococcosis in a common anaconda (*Eunectes murinus*) **J. of Zoo and Wildl. Med.** . v.25, p. 128-132 , 1994.

MEADOWS , R. L. ; MacWILLIANS , P. S. ; DZATA, G. & MEINEN , J. Chylothorax associated with cryptococcal mediastinal granuloma in a cat . **Veterinary Clinical Pathology** . v. 22, p.109 – 116 , 1993 .

MERKEL , G. J. & SCOFIELD , B . A . Conditions affecting the adherence of *Cryptococcus neoformans* to rat glial and lung cells in vitro. **J. Med . Vet. Mycol.** v.31, p. 55- 64 , 1993 .

MERKEL, G. J. ; SCOFIELD, B. ; RESCORRIA, F. & YANG, R. Comparison between in vitro glial cell adherence and internalization of nonencapsulated strains of *Cryptococcus neoformans* . **J. Med. Vet. Mycol.** v.32, p. 361-372 ,1994 .

MISAWA, N. ; NYUTA, S. ; UTOH, K. & KENDO, F. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from excreta of small birds in pet shops . **J. Japan Vet. Med. Association** . v. 46, p. 417-419 , 1993 .

MISHRA, S. K. ; STAIB, F. ; FOLKENS, U. & FROMTLING, R. A. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* strains isolated in Germany. **J. Clin. Microbiol.** v.14, p. 106 – 107 , 1981 .

MITCHEL, T. G. Micoses Sistêmicas . In : **Microbiologia** . 17^a ed. Buenos Aires, Panamericana, p. 1247 – 1276, 1993 .

MITCHEL, T.G. & PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans* . **Clin. Microbiol. Reviews** .v. 8, p. 515 – 548 , 1995 .

MONTENEGRO, H. & PAULA, C.R. Environmental Isolation of *Cryptococcus neoformans* var.gattii and *C. neoformans* variedade *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. **Med. Mycol.** v.38, p.385-390, 2000.

MORACE, G. ; ARCHIBUSACI , C. ; SESTITO, M. ; POLONELLI, L . Strain differentiation of pathogenic yeast by the killer system. **Mycopathol.** v. 84 p.81 –85 , 1984.

NISHIKAWA, M . M. ; SANT'ANNA, O. D. ; LAZERA, M. S. & WANKE, B. Use of D – proline assimilation and CGB medium for screening Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates . **J. Med. Vet. Mycol.** v.34, p.365 – 366 , 1996 .

NISHIKAWA, M.M.; LEITE, P.C.; CAVALCANTE, M.A.S.; LAZERA, M.S.; BARBOSA, G.G.; BALASSIANO, B.R.; TRILLES, L.; BEZERRA, C.C.F.; MACEDO, R.C. & WANKE, B. International Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis. setembro, 12-16, anais p. 188, 1999.

NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S.; BARBOSA, G.G.ET AL Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **J. Clin. Microbiol.** v. 45, p. 73-77, 2003.

NEILSON, J. V. ; IVEY , M. H. & BULMER, G. S. *Cryptococcus neoformans* : Pseudohyphal forms surviving culture with *Acanthamoeba polyphaga* . **Infect. Immun.** v.20, p.262 – 266 , 1978 .

NEVES, M.A., SILVA, A.D., FARIAS FILHO, L.P., FORTES, S.T. Novas fontes ambientais de *C. neoformans* var *gattii* Boa Vista, Roraima. **Anais IV Congresso de Brasileiro de Micologia**, Ouro Preto, Minas Gerais. 62 p., 2004.

NOSANCHUK, J. D. & CASADEVALL , A . Cellular charge of *Cryptococcus neoformans* : contributions from the capsular polysaccharide , melanin, and monoclonal antibody binding . **Infect. Immun.** v. 65, p.836 – 1841 , 1997.

NOUT, M. J. R. ; PLATIS, C. E. ; WICKLOW, D. T. Biodiversity of yeasts from Illinois maize . **Canadian J. Microbiol.** v. 43, p. 362 – 367 , 1997.

OLIVEIRA, M.T.B.de; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F.A.; LAZERA, M.S.; LENGELER, K.B.; HEITMAN, J., RIVERA, I.N.G.; PAULA, C.R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **J. of Clin. Microbiol.** v. 42, n. 3, 2004.

PADHYE, A . A . ; CHAKRABARTY , A . ; CHANDER , J . & KAUFMAN, L. *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in India . **J. Med. Vet. Mycol.** v. 31, p.165 – 168 , 1993 .

PFALLER, M.A. & WENZEL, R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 11, p. 287-291, 1992.

PFEIFFER, T.J. & ELLIS, D.H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans gattii* from California. **J. Infect. Dis.** 163, 1991.

PFEIFFER, T.J. & ELLIS, D.H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii* from *Eucalyptus teretecornis*. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 30, p. 407-408, 1992.

PAL, M.; DUBE, G.D.; MEHROTRA, B.S. Pulmonary cryptococcosis in a Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Mykosen.** v. 27, p. 309-312, 1984.

PAL , M. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* and munia birds . **Mycoses** . v.32, p. 250 – 252 , 1989 .

PAPPALARDO, M.S.C.M. Criptococose em Aids : estudo clínico e microbiológico em 35 pacientes acompanhados no Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo, entre 1995 e 1997. Dissertação (Mestrado). Coordenação do Instituto de Pesquisa da Secretaria de Saúde de São Paulo, 2002.

PAPALARDO, M.S.C.M. & MELHEM, M.S.C. Cryptococcosis: Review of the Brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v.45, n.6, p. 299-303, 2003.

PAPPAS, P. G. & PERFECT, J. **Cryptococcosis in the non – HIV infected patient.** In : International Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis , Abstracts ,p. 23 , 1999 .

- PASSONI, L. F. C. ; WANKE, B. ; NISHIKAWA, M. M. & LAZERA, M. S. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil : na analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis . **Medical Mycology** . v. 36, p. 305 – 311 , 1998 .
- PASSONI, L. F. C. Wood , animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection . **Rev. Iber. Micol.** v.16, p. 77-81 , 1999.
- PERFECT, J. R. ; KETABCHI, N. ; COX , G. M. ; INGRAM , C. W. & BEISSER, C. Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as na epidemiological tool . **J. Clin. Microbiol.** v. 31, p. 3305 – 3309 , 1993 .
- PFEIFFER, T. J. & ELLIS , D. H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from California . **J. Infect. Dis.** v.163, p. 929-930, 1991.
- PFEIFFER, T. J. & ELLIS , D. H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from *Eucalyptus tereticornis* . **J. Med. Vet. Mycol.** v.30, p. 407 – 408 , 1992 .
- POLACHECK , I. & KWON - CHUNG , K. J. Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillisporus* . **J. Bacteriol.** v.142, p. 15 – 20 , 1980 .
- POLACHECK , I. The discovery of melanin production in *Cryptococcus neoformans* and its impact on diagnosis and the study of virulence . **Int. J. Med. Microbiol.** v. 276, p. 120 – 123 , 1991.
- POLONELLI, L ; ARCHIBUSSACCI, C. ; SESTITO, M. ; MORACE, G. Killer System : a simple method for differentiating *Candida albicans* strains . **J. Clin. Microbiol.** v.17, p. 774 – 780 , 1983 .
- POWELL, K. E. ; DAHL , B. A. ; WEEKS, R. J. & TOSH , F. E. Airborne *Cryptococcus neoformans* : particles from pigeon excreta compatible with alveolar deposition . **J. Infect. Dis.** v. 125, p. 412 – 415 , 1972 .
- PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia.** v.20, p.7-14, 1982.
- RAMOS-BARBOSA, S.; GUAZZELLI, L.S.; SEVERO, L.C. Criptococose mamária após corticoterapia. **Rev. Soc. Brás. Med. Trop.** v.37, n. 1, 2004.
- RAMOS-VARA, J. A . ; FERRER, L . & VISA, J. Pathological findings in a cat with cryptococcosis and feline immunodeficiency virus infection. **Histology and Histopathology** . v. 9, p. 305-308 , 1994.
- RASO, T.F.; WERTHER, K.; MENDES-GIANNINI, M.J. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. **Med. Mycol.** v. 42, n. 4, p. 355-362, 2004.
- REFAL , M . ; TAHA, M . ; SELIM, A . ; ELSHABOURII, F. & YOUSSEFF, H. H. Isolation of *Cryptococcus neoformans* , *Candida albicans* and other yeasts from pigeon droppings in Egypt . **Sabouraudia.** v. 21, p. 163 – 165, 1983.

RHODES, J. C. ; POLLACHECK , I. ; KWON-CHUNG, K. J . Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans* . **Infect. Immun.** v. 36, p. 1175 – 1184 , 1982 .

RILEY, C. B. ; BOLTON, J. R. ; MILLS, J. N. & THOMAS, J. B. Cryptococcosis in seven horses . **Austr. Vet. J.** v. 69, p. 135 – 139 , 1992 .

RINALDI, M.G.; DRUTZ, D.J.; HOWELL, A.; WOFSEY, C.B.; HADLEY, W.K. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. **J. Infect. Dis.**, v. 153, p. 642, 1986.

ROBERTS, M. C. ; SUTTON , RL HL ; LOVELL, D. K. A protracted case of cryptococcal nasal granuloma in a stallion. **Austr. Vet. J.** v. 57, p. 287 - 291,1981 .

ROSARIO, I.; MENDOZA, M.H.; DENIZ, S.; SORO, G.; ALAMO, I.; ACOSTA, B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from cloaca of pigeons. **Mycoses.** v.48, p. 421-424, 2005.

ROZENBAUM, R. ; GONÇALVES, A. J. ; WANKE, B. & VIEIRA , W. *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in a Brazilian AIDS patient . **Mycopathol.** v.112, p. 33 – 34 , 1990 .

ROZENBAUM , R. ; GONÇALVES , A . J. ; WANKE , B. ; CAIUBY , M . J. ; CLEMENTE , H . L. ; LAZERA , M . D . S. ; MONTEIRO , P . C . F. & LONDERO , A . T. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. **Mycopathologia** . v. 119, p. 133-136 , 1992

ROZENBAUM , R. & GONÇALVES. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis . **Clin. Infect. Dis.** v. 18, p. 369 – 380 , 1994.

RUCHEL, R. ; TEGELLER, R. ; TROST, M. A comparasion of secretory Proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia.** v.20, p. 233-244, 1982.

RUIZ, A. ; NEILSON , J. B. & BULMER , G. S. Control of *Cryptococcus neoformans* in nature by biotic factors. **Sabouraudia.** v. 20, p. 21-29, 1982.

SALKIN, I. F. & HURD, N. J. New medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotype pairs . **J. Clin. Microbiol.** v.15, p. 169 – 171 , 1982 .

SALYER, W. R. ; SALYER , D. C. & BAKER, R. D. Primary complex of *Cryptococcus* and pulmonary lymphonodes . **J. Infect. Dis.** v. 130, p. 74 – 77, 1974 .

SANFELICE, F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succi di alcuni frutti. **Ann. Igiene.** v.4, p. 463-495, 1894. Apud MITCHEL, T.G. & PERFECT. Cryptococcosis in the Era of AIDAS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiology Reviews.** v.8, p. 515-548, 1995.

SANTANGELO , R. T. ; NOURI – SORKHABI , M. H. ; SORRELL , T. C. ; CAGNEY , M. ; CHEN , S. C. ; KUCHEL , P. W. ; WRIGHT , L.C. Biochemical and functional characterization of secreted phospholipase activities from

Cryptococcus neoformans in their naturally occurring state. **J. Med. Microbiol** . v. 48, p. 731-740 , 1999 .

SANT' ANNA , J. V . ; MARTINS , M. A . ; PUKINSKAS , S. R. B. S . ; MELHEM , M. S. C. and Laboratory Group on Cryptococcosis. Varieties of *Cryptococcus neoformans* in the state of São Paulo, Brazil . In : XIII Congress of ISHAM , Parma, Italy , **Abstracts**, p . 119, 1997.

SCOTT, D.W. ; MILLER, W.H. ; GRIFFIN, C.E. Muller & Kirks Small Animal Dermatology. 5^a ed. Philadelphia: **Saunders**, p. 373-378, 1995.

SHADOMY, H. J. & UTZ, J. P. Preliminary studies on a hipha – forming mutant of *Cryptococcus neoformans* . **Mycologia** . v.58, p. 383 – 390 , 1966

SHIMIZU, R.Y.; HOWARD, D.H.; CLANCY, M.N. The variety of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. **J. Infect. Dis.**, v. 154, p. 1042, 1986.

SIMON, J. ; NICHOLS, R.E. ; MORSE, E.V. An outbreak of bovine cryptococcosis. **J. Am. Vet. Ass.** v.122, p. 31-35, 1953.

SOARES, M.C.B. ; PAULA, C.R. ; DIAS, A.L.T. ; CASEIRO, M.M. ; COSTA, S.O.P. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med.Trop.** S. Paulo. v.47, n.1, p. 31-36, 2005.

SOUZA, L.K.H., ALVES, S.L.A., CHAGAS, A.B.C., LEMOS, J.A., FERNANDES, O.F.L., KOBAYASHI, C.C.B.A., SOUZA JR, A.H., SILVA, M.R.R. Etiologia da criptococose em Goiânia-Goais. Anais **IV Congresso de Brasileiro de Micologia**, Ouro Preto, Minas Gerais, 119 p., 2004.

SORREL, T.C. & ELLIS, D.H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 14, p. 42-43, 1997.

SPENCER , A . ; LEY, C. ; CANFIELD, P . ; MARTIN , P . ; PERRY, R . Meningoencephalitis in a koala (*Phascolarctos cinereus*) due to *Cryptococcus neoformans* var *gattii* infection . **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** . v. 24, p. 519 – 522 , 1993 .

STODDARD, J.L. & CUTLER, E.C. Torula infection in man. Rockefeller Institute for Medical Research, Monograph 6. New York, 1916. Apud CASADEVALL, A. & PERFECTE, J.R. *Cryptococcus neoformans*. **Washington, ASM Press**, 1998, 541p.

SWINNE - DESGAIN , D . *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin . **Sabouraudia**. v. 13, p. 303 – 308 , 1975 .

SWINNE – DESGAIN , D. *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons Following its experimental administration. **Sabouraudia**. v.14, p. 313–317, 1976

SWINNE, D. & EYCKMANS , L . Isolements de *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* du tube digestif de blattes (*Periplaneta americana*). **Medicine et maladies Infectieuses** . v. 14, p. 619, 1984.

- SWINNE, D. ; KAYEMBE, K. ; NIYIMI, M. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* varieade *neoformans* in Kinshasa, Zaire. **Ann. Soc. Belge Med. Trop.** v.66, p. 57-61, 1986.
- SWINNE – DESGAIN , D. ; DEPPNER, M. ; MANIRATUNGA , S. ; LAROCHE , R. ; FLOCH , J. J. & KADENDE, P . AIDS – associated cryptococcosis in Bujumbura , Burundi : na epidemiological study. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 29, p. 25 – 30 , 1991 .
- TABETA, H.; KOHNO, N. ; KAMEI, K. ; HONDA, A . ; UNNO, H.; NAGAO, K. ; YAMAGUCHI, T. ; MIYAJI, M. The defensive role of human pulmonary Alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes against a strongly or Weakly virulent strains of *Cryptococcus neoformans*. **Nippon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi** . v. 29, p. 1174, 1991.
- TORRES-GUERRERO, H. & EDMAN, J.C. Melanin – deficient mutants of *Cryptococcus neoformans*. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 32, p. 303-313, 1994.
- TOYAZAKI, N. *Cryptococcus* in natural environments, its isolation and physiological characters. **JPN J. Med. Mycol.** v. 35, p. 393-401, 1994.
- VADKERTIOVÁ , R. & SLAVIKOVA , E. Killer activity of yeasts isolated from the water environment . **Can. J. Microbiol.** v. 41, p. 759 – 766 , 1995 .
- VIDOTTO , V. ; SINICCO, A. ; Di FARIA , D. ; CARDAROPOLI , S. ; AOKI, S. & ITO-KUWA , S . Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans* . **Mycopathol.** v. 136, p. 119 – 123 , 1996 .
- VIDOTTO , V. ; LEONE , R. ; SINICCO, A . ; ITO-KUWA , S . ; CRISEO, G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bord droppings . **Mycopathol.** v.142, p. 71-76, 1998.
- VIDOTTO, V.; MELHEM, M.; PUKINSKAS, S.; AOKI, S.; CARRARA, C.; PUGLIESE, A. Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. **Rev. Iberoam. Micol.** v.22, p. 29-33, 2005.
- VINCENT, V. L . ; KLIG, L. S. Unusual effect of myo - inositol on phospholipid Biosynthesis in *Cryptococcus neoformans* . **Microbiology.** v.141, p. 1829 - 1837, 1995 .
- WANG, Y. ; AISEN , P . ; CASADEVALL, A . *Cryptococcus neoformans* melanin And virulence : Mechanism of action . **Infect. Immun.** v. 63, p. 3131-3136 ,1995
- WATT, D.A. A case of cryptococcal granuloma in the nasal cavity of a horse. **Austr. Vet. J.** v.46, p. 493-495, 1970.
- WILKINSON, G. T. Feline cryptococcosis . **Austr. Vet. Pract.** v.14, p. 64 , 1984 .
- WILSON, D. E. ; BENNETT , J. E. & BAILEY , J. W . Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans* . **Soc. Exp. Biol. Med.** v.127, p. 820-823 , 1968 .

WONG, B. ; PERFECT, J. R. ; BEGGS , S. ; WRIGHT , K. A. Production of the hexitol D – manitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro and in rabbits with and in rabbits with experimental meningitis . **Infect. Immun.** v. 58, p.1664 –1670 , 1990.

WRIGHT, L.C.; PAYNE, J.; SANTANGELO, R.T.; SIMPANYA, M.F.; CHEN, S.C.A.; WIDMER, F.; SORRELL, T.C. Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. **Biochem. J.** v. 384, pt 2, p. 377-384, 2004.

YASIN , M. S. M. ; SAMAD , S. A . ; VELLAYAN , S. Isolation of *Cryptococcus neoformans* in the aviaries of the National Zoo, Kuala Lumpur .**Tropical Biomedicine** . v. 8, p. 27 – 32 , 1991.

YINNON, A.M. ; SOLAGES, A. ; TREANOR, J.J. Cryptococcal peritonitis: REport of a case developing during continuous ambulatory peritoneal dialysis and review of the literature. **Clin. Infect. Dis.** v. 17, p.736-741, 1993.

ANEXOS

Anexo 1 – Ofício do Laboratório de Leveduras da UFRRJ

Anexo 2 - Meio contendo Dopamina

Anexo 3 - Meio de Christensen

Anexo 4 – Meio C.G.B.

Anexo 5 – Meio Ágar fosfolipase

Anexo 6 – Meio Ágar protease

Anexo 7 – Meio YEPD modificado e YPGA



Anexo 1

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
DEPTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA VETERINÁRIA

Do Professor Francisco de Assis Baroni
À Gerência da Loja “Animais e Cia”
Sr

Em (Data)

Assunto : cooperação com pesquisa científica (solicitada)

Estamos desenvolvendo na **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro** um trabalho que objetiva verificar a existência ou não de *Cryptococcus neoformans* em várias áreas da cidade do Rio de Janeiro. Trata-se de um microrganismo, mais especificamente uma levedura, que é patogênica principalmente para pessoas e animais que apresentam alguma deficiência imunológica, podendo inclusive causar meningoencefalite. Por outro lado, este microrganismo desenvolve-se em ambientes que contenham excretas aviárias. Sendo assim, vimos solicitar vossa preciosa colaboração na participação deste trabalho, permitindo a coleta de fezes de diversas aves em seu estabelecimento. Este trabalho estará a cargo do discente **Juan Rojas Pereira**, nosso orientado e, as visitas ao seu estabelecimento deverão ocorrer ao longo de todo o ano, com periodicidade mensal.

Esclarecemos que não haverá prejuízo para as suas atividades, uma vez que, independente dos resultados obtidos, não serão divulgados os nomes de quaisquer estabelecimentos. Tenha a certeza de que estará colaborando, juntamente com outros estabelecimentos já contatados, para o desenvolvimento de um projeto que visa colaborar com a saúde pública.

Desde já, agradecemos a preciosa colaboração.
Atenciosamente

Francisco de Assis Baroni
Prof. Adjunto
UFRRJ – IV - DMIV

Anexo 2

Meio contendo Dopamina Meio Base

KH ₂ PO ₄	0,4g
MgSO ₄	0,25g
Tiamina	1,0mg
Glicose	0,5g
Ágar	2,5g
Cloranfenicol	10mg
Amicacina	10mg
Água estéril	80mL

Solução contendo Dopa

Dopamina (Sigma)	0,004g
Asparagina (Sigma)	0,1g
Glutamina (Sigma)	0,1g
Glicina (Sigma)	0,1g
Creatinina (Sigma)	33mg
Água destilada	20mL

A solução base deve ser fundida e o seu pH ajustado para 5,5 com K₂HPO₄ se necessário. Autoclavar a solução base e resfriá-la a 55°C para adicionar a solução contendo dopa, esta previamente filtrada em membrana Millipore (0,22µm). Distribuir em placas.

Anexo 3

Meio de Christensen

Peptona	1,0g
Dextrose	1,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato dissódico	1,2g
Fosfato dihidrogenado de potássio	0,8g
Fenol vermelho	0,012g
Ágar-ágar	15,0g

Adicionar 2,4g do meio de composição básica em 95mL de água destilada, autoclavar a 115°C por 20 minutos. Resfriar a 50°C e em seguida adicionar 5,0 mL de solução de uréia a 40%, homogeneizar e distribuir o meio em placas.

Anexo 4

Meio C.G.B. (Kwon-Chung, 1982). Solução A

L-canavanina (Sigma)	30mg
Glicina (Sigma)	10mg
MgSO ₄	1 g
Tiamina (Sigma)	1mg
Água destilada	100mL

Acertar o pH a 5,6 e filtrar em Millipore (0,22µm).

Solução com indicador de pH

Azul de Bromotimol	0,4g
NaOH (0,01 N)	64mL
Água destilada	36mL

Solubilizar o azul de Bromotimol em 64mL de NaOH e adicionar 36mL de água destilada.

Solução B (Agar Base com o indicador)

Água destilada	880mL
Solução com indicador de pH	20mL
Ágar	20g

Autoclavar a Solução B, resfriar a 55°C, adicionar 100mL da Solução A, homogeneizar e distribuir em placas.

Anexo 5

Meio Aguar Fosfolipase (adaptado de Price et al, 1982)

Preparação da Gema de ovo

Gema de ovo	80g
-------------	-----

Imergir os ovos por 1 hora em álcool iodado. Separar as gemas logo em seguida e colocá-las em recipiente estéril, O volume necessário deverá ser pipetado para evitar a entrada de membrana da gema na composição.

Meio Agar Fosfolipase

Agar sabouraud dextrose	65 g
NaCl	57,3g
CaCl ₃	0,57g
Água destilada	1000mL

Esterilizar por autoclavagem a 121°C por 15 min, resfriar a misturar com preparo de gema de ovo. Distribuir em placas.

Anexo 6

Meio para proteinase (Ruchel et al, 1982)

Solução de estoque (filtrada p/1000mL)

Albumina bovina (BSA) fração V (Sigma)	2,0g
Protovit (Roche)	1,0g
Água destilada	100mL

Esterilizar por filtração em Millipore (0,22µm)

Solução Base (“Yeast Carbon Base”)

YCB (difco)	11,7g
Ágar	18,0g
Água destilada	900mL

Autoclavar solução base a 121°C, resfriar a 55°C e adicionar a solução de estoque na mesma. Distribuir em placas.

Anexo 7

YEPD – Modificado (Boekhout ; Scorzetti, 1997)

Extrato de Levedura	1%
Peptona	2%
Dextrose	2%
Agar	2%
Azul de metileno	0,003%
Tampão de Mcllvaine (ph 4,5)	100mL

Acertar pH tampão 4,5 – 4,6

Distribuir 10 mL do meio em cada tubo e autoclavar a 115°C por 15 minutos.

Tampão Mcllvaine (pH 4,5)

Na ₂ HPO ₄	2,83g
Ácido cítrico (Monohidratado)	2,1g
Água destilada	100mL

YPGA (Boekhout & Scorzetti, 1997)

Extrato de Levedura	0,5%
Peptona	1%
Glicose	2%
Agar	2%
Água destilada	100mL

Distribuir em tubos e autoclavar a 115°C por 15 minutos.