



UFRR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PROCISA

JOÃO MARCELO ALVES DE OLIVEIRA

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DOS AGENTES DA
CRIPTOCOCOSE ISOLADOS DE EXCRETAS DE POMBOS E POEIRA DO
SOLO NAS PROXIMIDADES DE ESTABELECIMENTOS DE SAÚDE NA
CIDADE DE BOA VISTA, RORAIMA

BOA VISTA, RORAIMA

2019

JOÃO MARCELO ALVES DE OLIVEIRA

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DOS AGENTES DA
CRIPTOCOCOSE ISOLADOS DE EXCRETAS DE POMBOS E POEIRA DO
SOLO NAS PROXIMIDADES DE ESTABELECIMENTOS DE SAÚDE NA
CIDADE DE BOA VISTA, RORAIMA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Roraima como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Gestão de Sistemas de Saúde. Linha de Pesquisa: Saúde, Educação e Meio Ambiente.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvana Tulio Fortes

BOA VISTA, RORAIMA.

2019

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

O48e Oliveira, João Marcelo Alves de.

Susceptibilidade a antifúngicos dos agentes da criptococose isolados de excretas de pombos e poeira do solo nas proximidades de estabelecimentos de saúde na cidade de boa vista, roraima/João Marcelo Alves de Oliveira – Boa Vista, 2019.

Orientadora: Profa . Dra. Silvana Tulio Fortes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1 –. 2 –. 3 –. 4 –. 5 –. I – Título. II – Fortes, Silvana Tulio (orientadora)

CDU –

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DOS AGENTES DA
CRIPTOCOCOSE ISOLADOS DE EXCRETAS DE POMBOS E POEIRA DO
SOLO NAS PROXIMIDADES DE ESTABELECIMENTOS DE SAÚDE NA
CIDADE DE BOA VISTA, RORAIMA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Roraima como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Gestão de Sistemas de Saúde. Linha de Pesquisa: Saúde, Educação e Meio Ambiente.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvana Tulio Fortes

Profa. Dra. Silvana Tulio Fortes
Orientadora/ PROCISA – UFRR

Profa. Dra. Fabiana Granja
PROCISA – UFRR

Prof. MSc. Halan Deny Dal Pupo
Faculdades Cathedral

Prof. Dra. Bianca Jorge Sequeira Costa
PROCISA – UFRR

Profa.Dra. Márcia Brazão e Silva Brandão
LACEN – UFRR

BOA VISTA, RORAIMA

2019

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que possam se beneficiar de alguma forma com os resultados dele: sejam pacientes, pesquisadores, estudantes ou profissionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus pela oportunidade de poder aprender e contribuir com a ciência.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais que fizeram todos os esforços para que eu pudesse estudar e ser um homem de bem.

À minha esposa e filhos, Layele, João Vicente e João Guilherme, pelo carinho de todas os dias felizes e noite, embora algumas em claro.

Às minhas alunas, Deborah Simone, Larah Yasmim que me ajudaram com as coletas e processamentos.

À Silvana Tulio Fortes, pelos ensinamentos e compartilhamentos imensos.

“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes de nossa responsabilidade é saber que outros creem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos”.

(Albert Einstein)

RESUMO

A criptococose é uma das infecções fúngicas de maior importância no campo médico, uma vez que seu acometimento está quase sempre associado a pacientes imunodeprimidos e pelo grave curso da doença. A distribuição dos seus agentes na natureza tem sido amplamente estudada nas últimas décadas, mas, muito há de se entender a respeito da sua distribuição, ciclo biológico e formas de aquisição da doença. Esse estudo, teve como objetivo principal, o estudo da susceptibilidade a antifúngicos de isolados dos agentes da criptococose em amostras de excretas de pombos e solo nas proximidades de estabelecimentos de saúde da capital Boa Vista, Roraima. Entre janeiro a abril foram coletadas 33 amostras de excretas de pombos e/ou poeira do solo nas proximidades de 10 estabelecimentos de saúde. Para determinação da identidade taxonômica dos isolados, leveduras do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* - *Cryptococcus gattii* foram empregadas provas de identificação bioquímica, que são em sua maioria baseadas em atividades enzimáticas, metabólicas e biológicas, sendo as provas de atividade de fenoloxidase, urease, crescimento em meio contendo L-canavanina, sensibilidade a cicloheximida, bem como ensaios de susceptibilidade a Fluconazol e Anfotericina B por disco difusão, utilizados para compreensão do perfil de sensibilidade ou resistência dos isolados. De um total de 15 amostras suspeitas oito foram confirmadas. Desse total, sete foram positivos para *C. neoformans* e um para *C. gattii*. Dentre os isolados de *C. neoformans*, quatro foram encontrados em amostras de solo e um de excreta de pombo. O único isolado de *C. gattii* foi proveniente de amostra de solo. Todos os isolados de *C. neoformans* apresentaram sensibilidade aos antifúngicos testados. Apenas *C. gattii*, nesse estudo, apresentou resistência ao Fluconazol; para Anfotericina B, esse isolado foi sensível.

Palavras-chave: Criptococose. Epidemiologia. *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*.

ABSTRACT

Cryptococcosis is one of the most important fungal infections in the medical field, since its involvement is almost always associated with immunosuppressed patients and the serious course of the disease. The distribution of its agents in nature has been widely studied in the last decades, but much has to be understood about its distribution, biological cycle and ways of acquiring the disease. The main objective of this study was to study the antifungal susceptibility of cryptococcosis isolates from excreta samples of pigeons and soil in the vicinity of health facilities in Boa Vista, Roraima. Between January and April, 33 samples of pigeons and / or soil dust were collected in the vicinity of 10 health establishments. In order to determine the taxonomic identity of the isolates, yeasts of the complex of *Cryptococcus neoformans* - *Cryptococcus gattii* were used biochemical identification tests, which are mostly based on enzymatic, metabolic and biological activities, being evidence of phenoloxidase activity, urease, growth in medium containing L-canavanine, susceptibility to cycloheximide, as well as susceptibility tests to Fluconazole and Amphotericin B by disk diffusion, used to understand the sensitivity or resistance profile of the isolates. Of a total of 15 suspected samples, eight were confirmed. Of these, seven were positive for *C. neoformans* and one for *C. gattii*. Among the isolates of *C. neoformans*, four were found in soil samples and one in pigeon excreta. The only *C. gattii* isolate was obtained from soil samples. All isolates of *C. neoformans* showed sensitivity to the tested antifungal agents. Only *C. gattii*, in this study, presented resistance to Fluconazol; for Amphotericin B, this isolate was sensitive.

Keywords: Cryptococcosis. Epidemiology. *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Locais de coletas dos substratos	38
Figura 2 - Metodologia utilizada para a identificação fenotípica dos isolados provenientes dos pontos de coleta	42
Figura 3 - Locais de coleta positivo para os substratos estudados.....	49

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1 – Controle de qualidade do meio de ureia com cepas padrão	41
Imagem 2 – semeio de amostra em NSA contendo colônia sugestiva de <i>Cryptococcus</i>	43
Imagem 3 – Placa de Ágar Mueller-Hinton com semeio de <i>C. neoformans</i> e discos de antifúngicos (Anfotericina B e Fluconazol) para ensaio de susceptibilidade	46
Imagem 4 - Exame direto da colônia com auxílio da tinta nanquim e coloração de Gram (1000x).....	48
Imagem 5 - Teste da ureia em tubo	48
Imagem 6 – Teste de sensibilidade a canavanina em meio CGB	52
Imagem 7 – Local de coleta do isolado identificado como <i>C. gattii</i> nas proximidades do Centro de Saúde Pastor Luciano Galdino Rabelo no bairro Centenário	54
Imagem 9 - Teste de confirmação para resistência do isolado de <i>C. gattii</i> ao fluconazol em teste utilizando as metodologias de inundação e semeio padrão com os meios ASD e AMH, respectivamente	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Critérios para análise de teste de sensibilidade para <i>Cryptococcus</i> por disco difusão segundo o fabricante CECON	45
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Locais coordenadas de localização e tipo de substrato coletado para os pontos de coleta substrato	39
Tabela 2 – Número de amostras positivas por substrato dos isolados dos agentes da criptococose obtidos de excretas de pombo (PB) e solo (SL) nas proximidades de estabelecimentos de saúde em Boa Vista.....	50
Tabela 3 – Caracterização bioquímica dos isolados por substrato para os isolados dos agentes da criptococose obtidos de excretas de pombo (PB) e solo (SL) nas proximidades de estabelecimentos de saúde em Boa Vista/RR.....	52
Tabela 4 – Dados meteorológicos do período das coletas	55
Tabela 5 - ensaios de susceptibilidade ao Fluconazol e Anfotericina B por disco difusão de isolados dos agentes da criptococose obtidos de excretas de pombo (PB) e solo (SL) nas proximidades de estabelecimentos de saúde em Boa Vista/RR	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
CBio	Centro de Estudos da Biodiversidade
UFRR	Universidade Federal de Roraima
OMS	Organização Mundial de Saúde
ASC	Ágar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol
NSA	Ágar Semente de Níger
CGB	Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol
AMH	Ágar Mueller-Hinton
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2.1. Criptococose: contexto histórico.....	20
2.2.1. Agentes etiológicos	22
2.2.2. Origem dos agentes e propostas de taxonomia	23
2.3. Patologia geral	25
2.4.1. <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	27
2.4.2. Fatores de virulência: breve contexto	27
2.5. Susceptibilidade a antifúngicos.....	28
2.6. Epidemiologia da criptococose no mundo.....	30
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. METODOLOGIA	36
4.1. Desenho do estudo	37
4.2. Determinação das áreas de coleta e substrato	37
4.3. Padronização inicial dos métodos, meios de cultura e utilização de cepas padrão:	40
4.4. Armazenamento dos isolados da pesquisa	41
4.6. Identificação dos isolados por meio de critérios fenotípicos	42
4.6.1. Morfologia da cultura suspeita pela Tinta Nanquim e Gram.....	42
4.6.2. Ensaio para estudo da atividade da fenoloxidação.....	43
4.6.3. Ensaio para estudo da atividade da urease	43
4.6.4. Habilidade de crescimento a 37°C	44
4.6.6. Determinação da identidade taxonômica por CGB.....	44
4.6.7. Teste de susceptibilidade a antifúngicos por disco difusão	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO.....	61
7. ANEXO.....	62
.....	62

8. REFERÊNCIAS.....	63
---------------------	----

1. INTRODUÇÃO

A importância clínica das infecções fúngicas tem aumentado drasticamente nas últimas décadas. Somente com o início da pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em 1980, a criptococose se tornou reconhecida. Também conhecida por torulose, blastomicose européia, doença de Busse-Buschke, é uma doença com evolução subaguda ou crônica, de natureza cosmopolita, causada pelo complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* - *Cryptococcus gattii*. Essas leveduras são responsáveis pelo desencadeamento de micose primariamente pulmonar, e que apresentam tropismo pelo sistema nervoso central (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004; PERFECT, 2010). A doença é adquirida pela inalação de propágulos infecciosos dos membros do complexo de espécies *C. neoformans* e *C. gattii* presentes no ambiente (PERFECT, 2005).

É importante definir criptococose por dois aspectos indispensáveis: uma doença causada pelo *C. neoformans* particularmente em imunodeprimidos e outra doença que tem se destacado pelo seu caráter primário, quando sua etiologia é causada pelo *C. gattii* (CONSENSO, 2008). Na clínica, observa-se que as manifestações da criptococose primária são mais severas que aquela oportunista causada por *C. neoformans* (HERKERT et al., 2017). Ambos agentes causam meningoencefalite, de evolução grave e fatal, acompanhada ou não de lesão pulmonar evidente, fungemia e focos secundários para pele, ossos, rins, supra-renal, entre outros (CONSENSO, 2008). Os órgãos mais afetados por essa micose são o Sistema Nervoso Central (SNC) e o trato respiratório. Entretanto a doença pode manifestar-se em qualquer órgão do corpo humano, e a disseminação pode ocorrer para múltiplos órgãos em pacientes que estão gravemente imunodeprimidos (PERFECT; CASADEVALL, 2002).

Em 2014 foi identificado no Brasil o primeiro caso de criptococose cutânea em paciente imunocompetente causada por *C. gatti* VGI (LEECHAWENGWONGSGS et al., 2014). Essa condição ocorre em 10 -15% dos casos de criptococose sistêmica e manifesta-se geralmente como consequência da fungemia. Pode apresentar lesões polimórficas, podendo manifestar-se sob a forma de pápulas, nódulos, placas, vesículas, bolhas, abscessos, celulite,

úlceras ou púrpura, mimetizando facilmente outras entidades, como molusco contagioso, sarcoma de Kaposi ou outras infecções fúngicas sistêmicas (DHARMSHALE et al., 2006; MURAKAWA et al., 1996).

A meningite criptocócica, uma das complicações mais graves da doença, está associada a mortalidade substancial, sendo a mais importante infecção fúngica oportunista com alta mortalidade em pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), mesmo com uso de terapia antifúngica, tornando-se uma das micoses mais importantes do mundo (ILLNAIT-ZARAGOZI et al., 2014; MAY et al., 2016; PARK et al., 2009). Segundo dados do Consenso em Criptococose (2008) acredita-se que mortalidade por criptococose é estimada em 10% nos países desenvolvidos chegando a 43% nos países em desenvolvimento, correspondendo aos achados de Ramirez e colaboradores (2017) que apontam que a meningite criptocócica é responsável por 42% da mortalidade em pacientes com infecções pelo HIV na América Latina.

No que se refere a ecoepidemiologia, os estudos envolvendo os agentes da criptococose se espalham por todo o mundo e em diferentes regiões do Brasil (BRITO-SANTOS et al., 2015; CICHON et al., 2011; CATTANA et al., 2014; FORTES, 2001; MAY et al., 2016). Diversas técnicas têm auxiliado a identificação do perfil ecoepidemiológico dos agentes da criptococose. As tecnologias de biologia molecular têm cada vez mais se desenvolvido, especialmente para realizar a diferenciação genética intraespecífica de *C. neoformans* e *C. gattii*. A técnica do polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição (RFLP, do inglês, Restriction Fragment Length Polymorphism), tem sido peça fundamental para esse processo como ferramenta para perfilar os tipos moleculares de *C. neoformans* (VNI, VNII, VNIII e VNIV) e *C. gattii* (VGI, VGII, VGIII e VGIV) (MEYER et al., 2003).

Estudos realizados por Trilles e colaboradores (2008) mostraram considerável diversidade genética entre as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*. Foi estudada a diversidade molecular de 443 isolados dentre isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii*, de 11 Estados brasileiros, inclusive Roraima.

A criptococose foi por muito tempo considerada uma doença tropical e subtropical; no entanto, um surto da doença na ilha de Vancouver, Canadá em 1999, região de clima temperado, pressupõe que *C. gattii* pode se adaptar a novos ambientes (KIDD et al., 2004).

Reforçando essa hipótese, Fortes (2001) mostrou que, apesar dos estudos indicarem a distribuição de *C. gattii* ligados a eucalipto e ambientes temperados, foi possível isolar essa levedura na Ilha de Maracá, Roraima, ambiente de floresta tropical, selvagem e sem ação do homem. Esse estudo abriu questionamentos para a discussão de novos conceitos a respeito do habitat do *C. gattii*.

Em 2013, Hagen e colaboradores elaboraram uma hipótese, com base em análise de recombinação filogenética, na qual propõe que os surtos de *C. gattii* (VGII) ocorridos na Ilha de Vancouver, Canadá e nos Estados Unidos tem origem em floresta de clima tropical na América do Sul, Brasil. Reforçando os estudos de Fortes em 2001.

Apesar de ser estudada desde 1894, somente nos últimos quase 50 anos as pesquisas em criptococose tem apresentado avanços significativo quanto a sua taxonomia, epidemiologia, estrutura capsular, fatores de virulência, sorotipos, genótipos específicos e susceptibilidade aos antifúngicos.

A frequência da criptococose no Brasil em pacientes com SIDA, em ordem de prevalência, é a segunda maior que acomete esse grupo de risco, contudo, o aparecimento de criptococose em imunocompetentes, especialmente em crianças, na Região Norte e Nordeste do Brasil, por *C. gattii*, suscita um olhar mais crítico e profundo sobre a doença (CORREA et al., 1999; SANTOS et al., 2000).

Há tempos se estuda no mundo inteiro dejetos de pombos como substratos naturais para *C. neoformans* (EMMONS 1955; CURRIE BP; FREUNDLICH; CASADEVALL 1994).

Em Roraima, a história da criptococose e seus estudos data desde 1997, quando foi possível realizar o primeiro diagnóstico da doença com o isolamento do agente, sendo um caso de infecção mista em indígena Yanomami (FORTES et al., 1999; FORTES et al., 2003). Nos últimos 20 anos foram diagnosticados

cerca de 50 casos de criptococose em Roraima e nos casos em que foi possível isolar o agente etiológico, houve caracterização fenotípica, o que possibilitou apontar perfil epidemiológico de criptococose oportunista em pacientes HIV positivo e criptococose primária em pacientes aparentemente imunocompetentes (FORTES, 2002; FORTES, 2003; MACEDO, 2007; REIS, 2018).

A detecção e identificação dos agentes da criptococose nas proximidades de estabelecimentos de saúde que albergam maior concentração de pombos e possível presença desses agentes em seus excrementos, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de propagação e aquisição da doença por indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes. Assim, este estudo visou contribuir com estudos que permeiam o contexto “hospedeiro-ambiente”, para compreender a ecoepidemiologia das leveduras do complexo de espécies *C. neoformans* – *C. gattii* na cidade de Boa Vista.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Criptococose: contexto histórico

Os primeiros registros de isolamento de *Cryptococcus* datam 1894 e 1895 por Sanfelice (1861-1945), nascido em Roma, Itália, fundador e primeiro diretor do Instituto de Higiene da Universidade de Cagliari, Itália. Naquele estudo, a partir de um sumo de pêssago que foi fermentado em frasco não-estéril, foi possível isolar pela primeira vez uma levedura que foi denominada *Saccharomyces neoformans*. Tal trabalho, marco inicial dos estudos sobre criptococose, foi publicado na Revista do Instituto de Higiene da Universidade do Cagliari, Itália (LACAZ, 2002). O segundo pesquisador, Otto Busse, Professor de patologia na Universidade de Greifswald, Alemanha, descreveu um patógeno perigoso removido de uma lesão na tíbia de uma mulher. Por considerar o organismo parecido com o gênero *Saccharomyces*, denominou o patógeno como *Saccharomyces hominis* (BARNETT, 2010).

Em 1901, Jean Paul Vuillemin (1861-1932), Professor de História Natural na Faculdade de Medicina da Universidade de Nancy, França, transferiu-os do gênero *Saccharomyces* para o gênero *Cryptococcus* (origem do grego, krypto –

oculto/secreto, e kokkos – grão/formato esférico), nesse momento ele considerou o fato de que o *Cryptococcus* não produz ascosporos (BARNETT, 2010).

Por volta de 1921, Rhoda Benham, da Universidade de Columbia, em New York e Jacomina Lodder no Centraalbureau voor Schimmelcultures em Delft apontaram que outros estudos, nos quais foram encontradas muitas leveduras e que na oportunidade receberam nomes diferentes, pertenciam à mesma espécie. Naquela época, Benham batizou a espécie considerando-as como *Cryptococcus neoformans*. Até que em 1950, Benham de forma bem-sucedida recomendou a adoção de '*Cryptococcus neoformans*' como o nome autêntico para os isolados (BARNETT, 2010).

Em 1895, Otto Busse, evidenciou em sua pesquisa, células com parede celular espessa e, em 1896 fez o primeiro esboço do que conhecemos hoje como sendo a cápsula da levedura. Em 1930, Arthur Henrici publicou um excelente desenho de um corte transversal de meninges infectadas por *C. neoformans*, na época, chamado de *Torula histolytica*, mostrando grandes espaços capsulares em torno das células de levedura, o material capsular era evidentemente secretado pela levedura e não formado pelos tecidos (GLEICA, 2016).

Mais tarde, Benham não só descreveu a cápsula e incluiu desenhos destas em seus estudos, como utilizou-as para produzir anticorpos aglutinantes, iniciando assim a caracterização antigênica desta espécie (BARNETT, 2010). Até meados de 1949, *C. neoformans* foi considerado uma espécie anamorfa homogênea (assexuada). Entre 1949 e 1960, Edward Evans e seus colegas publicaram uma série de artigos ampliando os estudos antigênicos de Benham. Três sorotipos foram descritos (A, B e C) com base nas diferenças antigênicas, o polissacarídeo capsular e, 20 anos mais tarde, um quarto sorotipo (D) foi descoberto. Esta foi a primeira evidência clara de que *C. neoformans* é taxonomicamente heterogêneo (BARNETT, 2010).

Os primeiros casos em que envolveram atividades fúngicas e que deram início aos estudos para a descoberta de uma nova espécie causadora de Criptococose, que não somente *C. neoformans*, veio com os estudos de Vanbreuseghem e Takashio (1970), os quais avaliaram um isolado atípico obtido de paciente com meningite criptocócica na República do Congo. Após experimentação animal, foram observadas formas atípicas, alongadas e até

mesmo baciliformes, ao lado de células clássicas redondas; em razão disto, foi proposto que aquele isolado fosse denominado *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (VANBREUSEGHEM; TAKASHIO, 1970).

Durante vários anos, acreditou-se que o agente da criptococose era uma única espécie de levedura capsulada com duas variedades, com diferenças marcantes nos aspectos antigênicos, bioquímicos, genéticos, ecológicos e epidemiológicos (KWON-CHUNG et al, 2002). Em 2006, Kwon-Chung e colaboradores propuseram a segregação em duas espécies: *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuilemin compreendendo duas variedades e três sorotipos [*C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e um sorotipo híbrido AD], enquanto *C. gattii* (Vanbreuseghem e Takashio) KwonChung e Boekhout compreende aos sorotipos B and C (KWON-CHUNG; VARMA 2006).

Contudo, os avanços tecnológicos envolvendo ferramentas moleculares, entre outras a reação do Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) dos genes do monofosfato de orotidina pirofosforilase (URA5) e da fosfolipase B (PLB1) possibilitaram a identificação de oito tipos moleculares principais: VNI e VNII (sorotipo A), VNIII (sorotipo AD), VNIV (sorotipo D), VGI, VGII, VGIII, e VGIV (sorotipos B e C); nenhuma correlação entre sorotipo e tipo molecular é relatada para *C. gattii* (MEYER et al, 2003). Diversos subtipos moleculares podem ser identificados pela técnica de “multi-locus sequence typing” (MLST) de diferentes genes (Meyer et al, 2009).

Embora haja a proposição de sete diferentes espécies para os agentes da criptococose (HAGEN et al, 2015), não há consenso na esfera científica para utilização de nova nomenclatura, de forma que neste trabalho será adotado o termo complexo de espécies de *Cryptococcus neoformans* - *Cryptococcus gattii*, conforme recomendado por KWON-CHUNG e colaboradores (2017).

2.2. Complexidade molecular das espécies de *Cryptococcus*

2.2.1. Agentes etiológicos

Os agentes da criptococose apresentam-se como leveduras globosas ou ovaladas, com 3 a 8µm de diâmetro, geralmente com brotamento único ou

múltiplo, de colo estreito, envolvidas por característica cápsula mucopolissacáride. São considerados como agentes etiológicos da criptococose as leveduras do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans* - *Cryptococcus gattii* e correspondem à forma assexuada de basidiomicetos zoopatógenos (CONSENSO, 2008). O componente capsular predominante é glucuronoxilomanana, determinante dos sorotipos A, D e AD pra *C. neoformans* e B e C para *C. gattii* (KWON-CHUNG et al., 2006).

2.2.2. Origem dos agentes e propostas de taxonomia

Discussões realizadas durante anos a respeito da taxonomia dos agentes da criptococose, pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, levaram ao entendimento de uma nova espécie, antes considerada apenas uma variação dentro de *Cryptococcus neoformans*. Por esse motivo, reconhecer *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* se fez necessário não só devido às suas diferenças biológicas e ecológicas, mas também pela suas diferentes interações com o estado imune do hospedeiro, uma vez que infecções por *C. gattii* foram documentadas prevalentemente em indivíduos imunocompetentes, enquanto a maioria dos pacientes infectados com *C. neoformans* foram em imunocomprometidos, sobretudo aqueles com infecção pelo HIV (SPEED; DUNT, 1995; CHEN et al., 2000).

A extensa diversidade genética e bioquímica dentro desses complexos tem sido amplamente consideradas para endossar discussões a respeito da taxonomia dos agentes da criptococose (KWON-CHUNG; VARMA, 2006). Kwon-Chung e colaboradores propuseram um documento em 2002 que estabeleceu a taxonomia de *C. gattii*, mas mesmo após a 6ª e 8ª Conferência Internacional sobre *Cryptococcus* e Criptococose (2005), onde foram conduzidos diversos debates a respeito da taxonomia dos agentes da criptococose, a discussão sobre o status taxonômico dos grupos genotípicos reconhecidos como *C. neoformans* e *C. gattii* permaceu. Essa confusão taxonômica vem afetando especialistas em doenças infecciosas e os microbiologistas clínicos mais do que os taxonomistas criptocócicos. Portanto, adotar a terminologia complexo de espécies não só é adequado, mas necessário para minimizar a confusão entre as comunicações

científicas que atuam em diferentes campos da pesquisa criptocócica e médicos, bem como os micologistas de diagnóstico (KWON-CHUNG; VARMA, 2006).

Kwon-Chung & Ashok Varma (2006), revisaram e atestaram a validade de conceitos utilizados para designar as duas espécies dos agentes da criptococose à luz dos três principais conceitos de espécies: Fenéticos (morfológicos, fenotípicos), biológicos (cruzamentos) e cladistas (evolutivos filogenéticos). A classificação das duas espécies de *Cryptococcus* em questão baseou-se no conceito de espécies genéticas e biológicas, que também é apoiado pelo conceito de espécies cladistas. Percebe-se que esse sistema de classificação reina até os dias atuais.

Ngamskulrunroj e colaboradores (2008) analisaram 73 de 2000 isolados coletados de todo o mundo e, com base na análise do sequenciamento multigênico, foi possível analisar, dentre outras coisas, que a topologia das árvores de genes estudadas individualmente eram idênticas para cada isolado de *C. neoformans*, mas incongruente para os de *C. gattii*, indicando eventos de recombinação recentes dentro de *C. gattii*. Os autores verificaram ainda fortes evidências de recombinação na população global de VGII.

Utilizando o métodos de PCR-fingerprinting (RAPD-PCR com iniciador M13) e RFLP do gene URA5, Meyer e colaboradores (1999, 2003) puderam identificar os 8 tipos moleculares designados de VN (I, II, III, IV) para *C. neoformans* e VG (I, II, III, IV) para *C. gattii*. Utilizando a técnica de AFLP, Boekhout et al. (2001), identificaram genótipos de *C. neoformans* e *C. gattii*. Comparados, estes dois métodos mostram correspondência entre si, bem como relação com sorotipos. Deste modo, *C. neoformans* corresponde aos genótipos: VN1/AFLP1, sorotipo A; VNII/AFLP1A, sorotipo A; VNIII/AFLP3, sorotipo AD; e VNIV/AFLP2, sorotipo D; e *C. gattii* corresponde aos genótipos: VG1/AFLP4, sorotipo B; VGII/AFLP6, sorotipo B; VGIII/AFLP5, sorotipo B; e VGIV/AFLP7, sorotipo C. Estes genótipos moleculares têm sido encontrados em grupos de acordo com a origem geográfica e também com variável distribuição global (KIDD et al. 2003). Contudo, não é possível observar um padrão molecular específico para *C. gattii* (LAZERA et al., 2007).

Os tipos VNI e VGI predominam no mundo como agentes de criptococose, mas na América Latina a distribuição e ocorrência de tipos moleculares de *C. gattii* apresenta perfil diferente dos demais continentes

(MEYER et al., 2003; TRILLES et al., 2003; BOEKHOUT, 2001). Estudos moleculares de agentes patogênicos contribuem para a compreensão da epidemiologia da Criptococose no Brasil.

Isolados clínicos e ambientais no Brasil mostram considerável diversidade genética de ambas as espécies, demonstrando ocorrência simultânea de diferentes tipos/genótipos (VNI/AFLP1, VNIV/AFLP2 e VGII/AFLP6) em ocos de árvores; e que diferentes gêneros de árvores e substratos de madeira, bem como tocas de animais, podem ser fontes de infecções humanas. Estudo a respeito dos tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* circulantes no Brasil sugere disparidade de distribuição regional destes genótipos. As regiões Sul e Sudeste apresentam como tipo molecular predominante VNI, atingindo, sobretudo pacientes imunocomprometidos, principalmente os com SIDA (CASALI et al., 2003; IGREJA et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2007). Diferentemente, nas regiões Norte e Nordeste o agente mais comumente encontrado é o tipo VGII sorotipo B, padrão endêmico para a região, causando doença principalmente em pacientes aparentemente imunocompetentes.

2.3. Patologia geral

Até a década de 1980 a incidência da criptococose foi considerada baixa, ocorrendo principalmente em pacientes com neoplasias hematológicas (linfomas, leucemias), colagenoses (principalmente lúpus eritematoso sistêmico-LES), transplantados e indivíduos em uso de corticosteróides. Com o aumento no número de casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), a criptococose tornou-se notada principalmente devido à imunossupressão do hospedeiro causada pela infecção do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; CASADEVALL; PERFECT, 1998).

A criptococose é uma micose oportunista sistêmica que acomete órgãos internos e pele, causada por uma levedura capsulada pertencente ao gênero *Cryptococcus*. Apresenta-se de forma subaguda ou crônica, afetando pacientes imunodeprimidos, principalmente pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), doenças hematológicas e imunossupressão terapêutica, ou imunocompetentes (MITCHELL; PERFECT, 1995; SIDRIM; MOREIRA, 1999).

A Criptococose é uma doença com evolução subaguda ou crônica, de natureza cosmopolita, e é responsável pelo desencadeamento de micoses primariamente pulmonar, e que apresentam tropismo pelo sistema nervoso central. Assim como as demais micoses sistêmicas, a criptococose é adquirida pela inalação de propágulos infectantes que se dispersam pelo ar (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004).

Apesar de não ser uma doença de notificação compulsória, o Ministério da Saúde registrou no período de 1980 a 2000 que 4,4 % das infecções oportunistas associadas à SIDA são por criptococose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000). O maior problema reside no fato de não ser uma doença de notificação compulsória e seus dados estarem atrelados apenas aos casos definidores de SIDA.

2.4. Aspectos clínicos gerais

Do ponto de vista clínico, a criptococose tem duas configurações etiológicas distintas: Criptococose caracteristicamente oportunista, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular, especialmente HIV, tendo como principal agente *Cryptococcus neoformans* e Criptococose primária, apresentando hospedeiro aparentemente imunocompetente, causada predominantemente por *Cryptococcus gattii* (CONSENSO, 2008). Entretanto, o diagnóstico de meningoencefalite criptocócica em indivíduos sem comprometimento imunológico é relevante em áreas tropicais e subtropicais (SANTOS, 2000; MARTINS, 2003). Apesar da doença causada por *C. gattii* ter características endêmicas em áreas tropicais e subtropicais, mais recentemente alguns estudos têm colaborado para o desfecho de novos nichos ecológicos desse agente (SANTOS, 2000; MARTINS, 2003; YAMAMURA et al., 2013; MAY et al., 2015; HERKERT et al., 2017).

A infecção pulmonar primária é geralmente assintomática ou minimamente sintomáticos apesar das altas taxas de reatividade sorológica em crianças em determinados ambientes urbanos. A eliminação da infecção pelo hospedeiro pode ocorrer, no entanto, em muitos indivíduos, após as leveduras

se depositarem nos alvéolos, encontram macrófagos alveolares, que desempenham um papel central na resposta imunológica (PERFECT, 2005).

C. neoformans e *C. gattii* têm uma grande predileção para se estabelecerem nos pulmões e sistema nervoso central. Ocasionalmente ocorrem infecções na pele, próstata, olhos, ossos e articulações, podendo se disseminar amplamente e infectar a maioria dos órgãos em pacientes gravemente imunodeprimidos e, portanto, podendo aparecer em qualquer local do corpo humano (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

No Estado do Amazonas, 70% das infecções são causadas por *C. neoformans*, atingindo principalmente jovens infectados pelo HIV. As infecções por *C. gattii* atingem todas as faixas etárias, sem HIV na maioria dos casos (SILVA et al., 2012; FREIRE et al., 2012).

2.4.1. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Tradicionalmente *C. neoformans* está associado a excretas de pombo e outros pássaros, mas tem distribuição mundial, incluindo solo, ocos de árvores e madeira em decomposição. *C. gattii* teve ocorrência registrada em climas tropicais e subtropicais associado a espécies de árvores como eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus tereticornis*), oiti (*Moquilea tomentosa*), cassia rosa (*Cassia grandis*) e ficus (*Ficus microcarpa*) (CHATURVEDI, 2010; ELLIS; GRANADOS; CASTAÑEDA, 2005; LAZÉRA et al., 1998; PFEIFFER, 1990). Porém, foi encontrado em região de clima temperado (KIDD et al., 2004).

2.4.2. Fatores de virulência: breve contexto

O estabelecimento de um quadro clínico e a disseminação da infecção tem uma estreita relação com a imunidade do hospedeiro (LARSEN, et al, 1994). Os fatores de virulência clássicos de *C. neoformans* e *C. gattii* incluem a formação da cápsula, a produção de pigmentos de melanina, e a capacidade de crescer a 37°C (CASADEVALL; PERFECT, 1998; PERFECT, 2005; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

A cápsula polissacarídica antifagocítica proeminente, que é composta de glucuronoxilomanana, é considerada um fator de virulência essencial que tem múltiplos efeitos na imunidade do hospedeiro e pode aumentar de tamanho com a exposição aos tecidos do corpo e fluidos (ZARAGOZA et al., 2010). A enzima que catalisa a conversão de compostos difenólicos para formar a melanina, pode ter um papel biológico para proteger as leveduras contra stresses oxidativos no hospedeiro e pode explicar parcialmente o neurotropismo do organismo para locais com altas concentrações das catecolaminas difenólicas. A capacidade de crescer a 37°C é uma característica básica de virulência para os fungos mais patogênicos em seres humanos, e estudos moleculares ligaram o crescimento em altas temperaturas a múltiplas vias de sinalização e enzimas que esta levedura adquiriu ou adaptou ao longo do tempo para reter ou aumentar a sua patogenicidade em mamíferos. Outros fatores de virulência incluem fosfolipase e produção de urease e várias enzimas associadas com a proteção contra o estresse oxidativo, conferindo sobrevivência dentro do fagolisossomo (COELHO et al., 2014).

A produção de melanina que se deposita na parede do fungo é proveniente de substratos contendo dopamina. Sabe-se que o cérebro é rico em substratos para a fenoloxidase tais como a dopamina, o que explicaria a propensão a infecções do SNC por esses fungos (KUROKAWA et al., 1998).

O termotropismo humano é característica essencial para o desenvolvimento de virulência para os fungos mais patogênicos e estudos moleculares relacionaram o crescimento em altas temperaturas a múltiplas vias de sinalização e enzimas que esta levedura adquiriu, ou adaptou, ao longo do tempo para reter, ou aumentar, a sua patogenicidade em mamíferos (COELHO et al., 2014).

2.5. Susceptibilidade a antifúngicos

Diferente do que acontece com as bactérias, a indução de variantes resistentes a antifúngicos é considerada um fenômeno raro, uma vez que não há conhecimento de elementos genéticos que codifiquem resistência a antifúngicos e que possam ser transferíveis de fungo a fungo, embora seja possível encontrar na literatura experiências que compartilham a respeito da

resistência de fungos às drogas disponíveis comercialmente (PFALLER, 1992; PAPPALARDO, 2003; MORAES, 2003; KHAN, 2007; SIDRIM, 2010).

À exemplo, Pfaller e colaboradores (2005) estudaram 1.811 isolados de *Cryptococcus neoformans* de 100 centros médicos de 5 regiões geográficas diferentes. Este estudo constatou que os isolados da África, América Latina, Europa e do Pacífico são mais sensíveis ao Fluconazol que isolados da América do Norte.

Existem descrições na literatura e diferentes tipos de ensaios para a determinação da resistência dos microrganismos frente aos fármacos aplicados em sua terapêutica. De modo geral, as técnicas mais utilizadas são: diluição em caldo, diluição em ágar e difusão disco em ágar.

Espinel-Ingroff e colaboradores (2012a, 2012b) propõem a utilização do conceito de aplicação de fármacos, baseando-se na epidemiologia da criptococose, “espécie-específicos” para anfotericina B, flucitosina (2012a), fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol (2012b), contra *C. neoformans* e *C. gattii*. Os valores propostos para *C. neoformans* são: anfotericina B, 0,5µg/mL; flucitosina, 8µg/mL; fluconazol, 8µg/mL; itraconazol, 0,25µg/mL; posaconazol, 0,25µg/mL; e voriconazol 0,25µg/mL. Para *C. gattii* são propostos: 1,0µg/mL para anfotericina B; 16µg/mL para flucitosina; 32µg/mL para fluconazol; 0,5µg/mL para itraconazol; 0,5µg/mL para posaconazol; e 0,25µg/mL para voriconazol.

Até o momento, os métodos de referência disponíveis para determinar a susceptibilidade *in vitro* contra as drogas antifúngicas, o M27-A3 and EDef 7.2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), respectivamente, não incluem pontos de corte para qualquer droga antifúngica contra isolados de *C. neoformans* e/ou *C. gattii* (CLSI M27-A3, 2008; EUCAST EDef 7.2, 2012). Assim, as categorias sensível/resistente não devem ser utilizadas devido à ausência de pontos de interrupção interpretativos para estas leveduras (CÓRDOBA et al., 2016). Mesmo assim, alguns fabricantes, tem desenvolvido metodologias que tem permitido realizar ensaios clínicos na qual tem sido possível determinar isolados resistentes.

2.6. Epidemiologia da criptococose no mundo

A epidemiologia da criptococose tem reflexo direto no comportamento ecológico dos agentes etiológicos. Por um lado, as infecções por *C. neoformans* ocorrem em todo o mundo, configurando importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, especialmente quando desenvolvem SIDA, sendo automaticamente considerado um agente oportunista e colocando a criptococose na esfera das micoses oportunistas. Do outro lado o *C. gattii* é normalmente considerado um patógeno primário, infectando hospedeiros aparentemente imunocompetentes (KWON CHUNG; BENNETT, 1992; LAZERA et al., 2005).

No mundo, estima-se que a infecção criptocócica cause cerca de um milhão de casos de meningite por ano entre pessoas com SIDA no mundo, resultando em aproximadamente 625 mil mortes (CDC, Atlanta, EUA).

Em 1977 o estudo mundial de KWON-CHUNG a respeito da epidemiologia desta micose mostrou uma prevalência relativamente alta de isolados de origem australiana, brasileira e do Camboja. Esse estudo deu início ao que hoje vem se desenhando quanto ao perfil ecoepidemiológico dos agentes da criptococose, uma vez que a prevalência de *Cryptococcus gattii* variou de 35 a 100%. Considerando os países e suas respectivas regiões ficou fácil afirmar que *C. gattii* é predominante apenas em regiões tropicais e subtropicais.

Após a década de 1970, houve diversos indícios de que *Cryptococcus neoformans* se comportava diferente frente algumas condições, no que se refere às suas características bioquímicas, moleculares, ecológicas (especificamente com *Eucalyptus camaldulensis*) e sobretudo patogenicidade. Através dos estudos desenhados a partir dessa década foi possível entender onde *Cryptococcus* acontecia, especialmente *C. gattii*, suas características de afinidade com o estado imunológico e seu padrão de acontecimento tanto em portadores do HIV, como em indivíduos aparentemente saudáveis. Além, de permitir entender seu perfil ecoepidemiológico, uma vez que *C. gattii* estava diretamente ligado a pacientes que residiam em regiões rurais.

A patogênese de *C. gattii* está relacionada a lesões na massa cerebral e/ou hidrocefalia e lesões de massa pulmonar (KWON-CHUNG, 1975; KWON-CHUNG, 1978). Num momento em que ainda não se conheciam as variações

moleculares dos agentes da criptococose, Dromer e Dupont descreveram o que consideraram o primeiro caso de criptococose por *C. neoformans* var. *gattii* em artigo publicado em 1992. Esse relato refere-se a um paciente cambojano, sem SIDA e que vivia na França por 23 anos onde desenvolveu criptococose em 1985. A origem da infecção não é certa, uma vez que o paciente esteve na Ásia e no Zaire. Neste estudo já se especulava a reativação de infecção latente causada por *C. gattii* assim como nos estudos de Hagen e colaboradores mais tarde em 2010.

Abraham e colaboradores (1997) relataram a primeira cultura comprovada de *C. gattii* sorotipo B em paciente com SIDA na Índia. Em 2000 um homem de 47 anos, sem HIV, de Singapura apresentou sintomas como: confusão, febre, perda de peso e tosse. Numa investigação a respeito do caso descobriu-se que ele visitou Bangkok, Tailândia, em abril de 2000 e Kuala Lumpur, na Malásia, em junho de 2000; também fez passeios em Johor Bahru, Malásia, mas não se especulou a respeito da origem da infecção. O diagnóstico final foi de criptococose por *C. gattii*. Mesmo depois do tratamento os exames continuaram mostrando a presença das leveduras no SNC, persistindo alguns sintomas, fato que permitiu concluir naquele momento que *C. gattii* se comportava de forma diferente e merecia atenção dos médicos na época (TAYLOR et al., 2002). Taylor e colaboradores ainda estudaram 24 isolados de *C. neoformans* provenientes de 22 pacientes de Singapura por um período de 18 meses; um desses isolados foi identificado como sendo *C. neoformans* var. *gattii*, algo novo para a época em Singapura.

A doença foi considerada tropical e subtropical; no entanto, um surto de criptococose em região de clima temperado, na ilha de Vancouver, Canadá, sugere que *C. gattii* pode se adaptar a novos ambientes (KIDD et al., 2004). O surto de criptococose causada por *C. gattii* (VGII) na Ilha de Vancouver, British Columbia, Canadá em 1999, motivou diversos pesquisadores a buscarr melhor os fatores que contribuíram para tal evento, além de colaborarem para o cenário mundial no estudo epidemiológico da criptococose, uma vez que esse isolado tem se mostrado um importante agente de infecções pulmonares e neurológicas graves nesta região (KIDD et al., 2004). Na ocasião foi encontrado no ar da ilha propágulos infecciosos da levedura no qual acredita-se estar ligada com o início da infecção. No estudo verificou-se que todos os isolados que causaram o surto

provaram ser de acasalamento típico e demonstraram alta capacidade de esporulação. Ainda foram identificados dois sub-tipos patogênicos de VGII designados pelos autores como VGIIa e VGIIb, entre esses isolados.

Segundo KIDD e colaboradores (2004), o surto na ilha afetou mais de 200 humanos e muitas centenas de animais. A taxa de infecção por *C. gattii* entre cidadãos e visitantes da Ilha de Vancouver é aproximadamente 39 vezes maior que no norte da Austrália, onde *C. gattii* é considerado endêmico. Demonstrou-se que mais de 80% dos residentes provados da Ilha de Vancouver possuem anticorpos para essa espécie (GALANIS et al., 2009).

NGAMSKULRUNGROJ em 2008 estudou a fertilidade de 91 isolados do surto da Ilha de Vancouver quando comparou com os 72 isolados VGII selecionados globalmente. De todos os isolados, 69,94% foram férteis e exibiram grampos de conexões e basidiósporos. Os isolados de Vancouver mostraram alta taxa de fertilidade (84,2%) quando comparado a 29% dos 21 isolados australianos investigados. Por fim, o estudo sugeriu que existe uma clara correlação entre os subtipos VGII de *C. gattii* e seu acasalamento/fertilidade. Esse estudo abriu portas para outros momentos importantes no desfecho da criptococose. Em 2010, Hangen publicou um estudo de caso onde descreve uma paciente de 42 anos, HIV negativo, com quadro clássico de criptococose, em 2007. Ao se estudar a cepa causadora da doença observou-se que o isolado em questão tratava-se de *C. gattii* (VGIIb). O estudo do genótipo desse isolado demonstrou que se tratava de um isolado completamente idêntico ao do surto na Ilha de Vancouver. Mais tarde identificou-se que a paciente esteve na ilha um ano antes do aparecimento dos sintomas.

Bovers e colaboradores (2008) mostraram em seus estudos um isolado de um paciente com SIDA de 31 anos de Montreal, Quebec, Canadá, que morreu apesar do extenso tratamento antifúngico com cetoconazol e anfotericina B. Nesse estudo os resultados indicaram que a cepa em questão era monocariótica, diplóide ou aneuplóide com o novo sorotipo AB. Concluindo que este isolado é um novo híbrido aneuploide de *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A/VNI) e *C. gattii* (sorotipo B/VGI). Outro estudo que discute essa variabilidade e particularidades dos agentes da criptococose é o de Hagen e colaboradores (2010) que investigaram um surto de criptococose causada por *Cryptococcus gattii* na Ilha de Vancouver e no Pacífico Noroeste que afetou mais de 200

residentes das ilhas, dos quais oito foram a óbito. Um ponto especial nesse estudo foi que um dos pacientes que adquiriu a criptococose causada por *C. gattii* na Ilha de Vancouver e após um ano desenvolveu os sintomas. O estudo apontou indícios de que *C. gattii* pode causar uma infecção adormecida e que pode ser ativada durante episódios de imunodepressão.

2.7. Isolamento de *Cryptococcus* em excretas de pombos

A partir dos isolados de Emmons outros vários estudos têm reportado o isolamento de *C. neoformans* de diferentes fontes naturais nos vários continentes, evidenciando sua ampla distribuição em zonas tropicais e temperadas (COSTA, 2008). A exemplo, excretas de pombos e detritos encontrados em seu habitat são os mais associados ao isolamento de *C. neoformans*, (PAL, 1997; MONTENEGRO; PAULA, 2000; BERNARDO et al., 2001; REOLON et al., 2004; CERMENO et al., 2006).

Em contrapartida, excretas de outras aves também tem sido relacionada aos achados de *Cryptococcus*, incluindo canários (GRISEO et al., 1995 apud CASADEVALL & PERFECT, 1998; FILIU et al., 2002) papagaios (LOPEZ MATINEZ; CASTANONOLIVARES, 1995 apud CASADEVALL; PERFECT, 1998; ABEGG et al., 2006) periquitos (FILIU et al., 2002; ABEGG et al., 2006) galinhas (SWINNE et al., 1986 apud CASADEVALL; PERFECT, 1998), várias espécies (LUGARINI et al., 2008).

Estudos tem evidenciado que é mais comum encontrar a levedura em excretas de pombos acumuladas por vários anos em espaços urbanos abrigados, como em torres, prédios antigos, cúpulas, sacada de janelas, além de estábulos em áreas rurais (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Os achados de *Cryptococcus* em excretas de pombos e de outras aves tem explicação pautada na necessidade dos mesmos precisarem sobreviver em ambientes ricos em compostos nitrogenados (STAIB, 1962 apud, KWON-CHUNG; BENNETT, 1992), pois sabe-se que *Cryptococcus neoformans* utiliza creatinina como fonte de nitrogênio, enquanto outras espécies deste gênero não o fazem. Embora *C. gattii* não ocorra em excretas de pombos, testes realizados *in vitro* provaram que essa espécie também utiliza creatinina como fonte de nitrogênio (POLACHEK; KWON-CHUNG, 1980).

A creatinina-deiminase encontrada em ambas as espécies é responsável pelo catabolismo da creatinina, promovendo a conversão em metil-hidantoina e amônia. Há relatos de diferenças na atuação dessa enzima na regulação, o que pode influenciar na incapacidade de *C. gattii* em colonizar excretas de aves. A deiminase é responsável pelo metabolismo da creatinina em *C. neoformans* e reprimida pela amônia, o mesmo não acontece com *C. gattii*. (POLACHEK; KWON-CHUNG, 1980).

2.8. Isolamento de *Cryptococcus* em poeira do solo

O isolamento de *Cryptococcus* em amostras de poeira e solo tem sido frequentemente reportado como nicho ecológico importante para *C. neoformans* (EMMONS, 1951; AJELLO, 1956; AJELLO, 1958). A maioria dos relatos em solo refere-se a amostras coletadas em celeiros, aviários, ambientes considerados de risco de contaminação com excretas de aves (AJELLO, 1956; AJELLO, 1958; MACHADO et al., 1993; CURO et al., 2005; BARONI et al., 2006).

As pesquisas a respeito do isolamento de *Cryptococcus* no ambiente tem avançado. No Rio de Janeiro, foram coletadas 824 amostras ambientais em 154 residências incluindo poeira domiciliar, solo de área externa domiciliar. Como resultado foram isolados *C. neoformans* em 15,6% das 32 residências de pacientes com Criptococose associada a SIDA, em 8,9% das 45 residências de pacientes com SIDA, mas sem Criptococose e em 14,3% das 77 residências de indivíduos saudáveis (PASSONI et al., 1998). O isolamento de *C. neoformans* em 13% das 154 residências reforça a observação da exposição frequente do ser humano ao fungo.

Ainda no que se refere ao ambiente domiciliar e peridomiciliar, particularmente a poeira doméstica, pode apresentar positividade entre 50% e 13% (BARONIET, al., 2006). Certa vez, em estudo realizado em Porto Alegre Reolon e colaboradores (2004) constaram presença de *Cryptococcus neoformans* em 100% das amostras coletadas em cinco praças da capital gaúcha.

Apesar de os primeiros isolamentos de *C. gattii* ser ligado as árvores de eucaliptos como principal fonte, alguns estudos recentemente publicados com amostras ambientais têm sugerido a presença cosmopolita de *C. gattii* ocupando

nichos ecológicos similares aos do *C. neoformans*, associando-o a madeira em decomposição, restos de vegetais e solo (ELLIS; PFEIFFER, 1990; CHAKRABARTET, 1997; PFEIFFER; ELLIS, 1992; RESTREPO et al, 2000; FORTES et al, 2001; HALLIDAY; CARTER, 2003; VILCINS et al., 2002; CASALI et al., 2003; GRANADOS; CASTANEDA, 2006; MONTENEGRO; PAULA,2000; REFOJO et al., 2009; PFEIFFER; ELLIS, 1991; CHAKRABART et al., 1997; COGLIATI, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Contribuir com o conhecimento da ecoepidemiologia dos agentes da criptococose em Boa Vista/Roraima bem como a susceptibilidade destes agentes a antifúngicos.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar a presença de agentes da criptococose em excreta de pombo e poeira do solo nas proximidades de estabelecimentos de saúde.

Identificar taxonomicamente os isolados obtidos, por meio de características fenotípicas.

Conhecer o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol frente aos isolados obtidos.

4. METODOLOGIA

4.1. Desenho do estudo

O delineamento metodológico deste estudo refere-se a uma pesquisa prática descritiva, transversal, do tipo qualitativo, do qual faz parte do macroprojeto: “Criptococose e seus agentes em Roraima”, desenhado para estudar cepas de isolados ambientais dos agentes da criptococose provenientes de excretas de pombos (*Columbia livia*) e solo encontrados nas proximidades de estabelecimentos de saúde na cidade de Boa Vista, Roraima.

4.2. Determinação das áreas de coleta e substrato

Em 2015, estimava-se para o Estado de Roraima 505.665 habitantes, na qual, 65,3% dos habitantes encontravam-se na capital, Boa Vista. O estado está situado na Região Norte do país, sendo o estado mais setentrional da federação, ocupando uma área aproximada de 224,3 mil km². Em Roraima predomina o clima similar ao dos estados da Região Norte que abrigam a Floresta Amazônica, consistindo basicamente de clima equatorial e tropical-úmido, com temperatura média oscilando entre 20 °C e 38 °C; de modo geral, o clima varia de acordo com a região do estado (IBGE, 2010).

O lavrado constitui uma região de 43.281,519 km² (5.734,067 de área municipal no lavrado) na qual essa região abrange nove dos quinze municípios de Roraima, com destaque para o município de Boa Vista, totalmente dentro do domínio do lavrado. Do total de habitantes, 324.489 residem em região de lavrado, isso representa cerca de 72% da população total do Estado.

Em Roraima o lavrado abrange 19,30% do Estado, uma área relativamente grande em relação contraste da floresta densa, que predomina na Amazônia. Visualmente, o lavrado roraimense lembra o savana, no entanto, essas semelhanças só seguem até este ponto, já que o lavrado possui seus próprios atributos ecológicos e geográficos, nos permitindo acreditar o quão rico é a biodiversidade microbiana regional.

Existem cerca de 20 unidades de estabelecimentos de saúde na capital Boa Vista, dentre estabelecimentos públicos e privados que atendem a

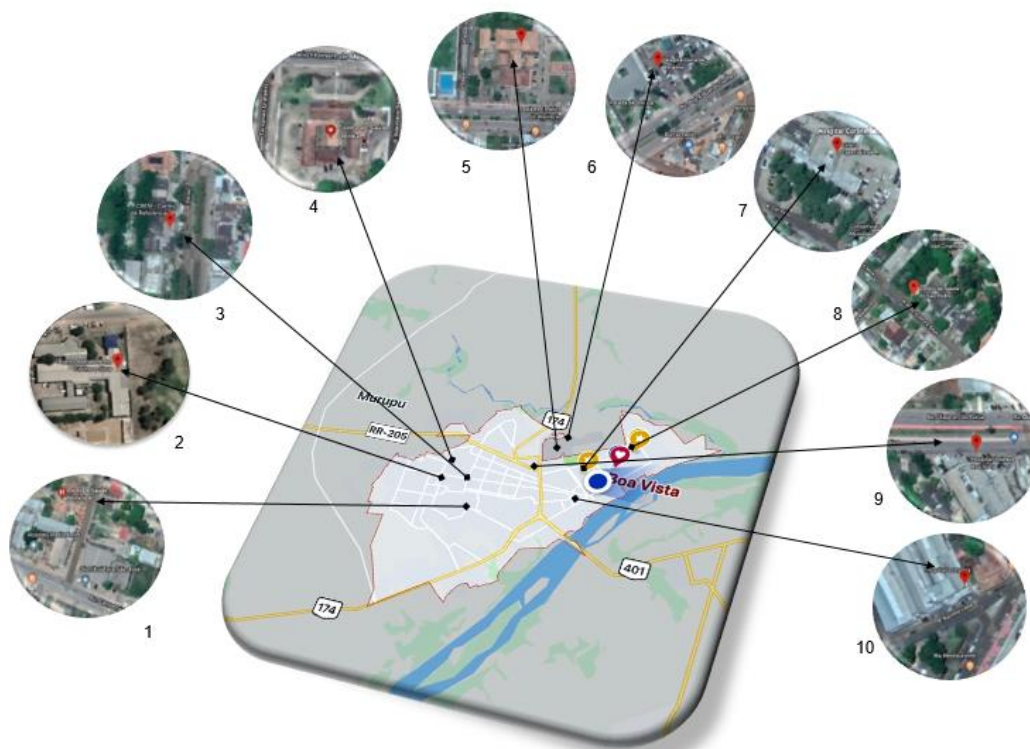
população e que oferecem diversos serviços de saúde associados não somente a recuperação, mas a promoção e manutenção da saúde da população.

Os principais critérios para a escolha dos locais de coleta foram: 1) proximidades a estabelecimentos de saúde; 2) fluxo contínuo de pessoas em tratamento ou não nas unidades; 3) presença de pombos e excretas nas proximidades dos estabelecimentos.

Assim, foram coletadas amostras de excretas secas de pombos e/ou poeira do solo nas proximidades de 10 dos principais estabelecimentos de saúde da capital Boa Vista, Roraima (Figura 1), considerando seu fluxo de atendimento e localização, no período de janeiro a abril de 2019.

Além das coletas, foram observados dados como temperatura do dia da coleta, bem como dados de temperatura relativa do ar.

Figura 1 – Locais de coleta dos substratos para pesquisa dos agentes da criptococose nas proximidades dos estabelecimentos de saúde



Locais de coleta: Proximidades do Centro de Saúde Olenka Macelaro (1); Policlínica Cosme e Silva (2); Centro de Referência de Especialidades Mecejana (3); Centro de Saúde Pastor Luciano Galdino Rabelo (4); Centro de Saúde Bairro São Pedro (5); Hospital Geral de Roraima (6);

Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima (7); Clínica Especializada Coronel Mota (8); Hospital Unimed; e Hospital Lotty Iris (10).

Em cada local de estudo foram coletadas três amostras de pelo menos um tipo de substrato em pontos distintos. De acordo com a tabela 1 o estudo é composto por 12 amostras de excretas de pombos e 21 amostras de poeira do solo, o que perfaz um total de 33 amostras. No Centro de Saúde Olenka Macelaro foram estudados os dois tipos de substrato.

A poeira de solo foi coletada em calçadas e ruas nas proximidades dos estabelecimentos de saúde, bem como os excremento de pombos em locais próximos aos estabelecimentos de saúde. As amostras foram coletadas com auxílio de espátula estéril, acomodadas em placa de Petri estéril devidamente identificada e transportadas ao laboratório de Práticas Multidisciplinares 5 (clínica biomédica) do Claretiano Centro Universitário para posterior análise. O processamento do material para isolamento dos agentes da criptococose ocorreu em até 24 horas após a coleta.

Tabela 1 – Locais, coordenadas de localização e tipo de substrato coletado para os pontos de coleta em época de seca

LOCAL (Proximidade)	LOCALIZAÇÃO	SUBSTRATO COLETADO	
		Excreta	Solo
Centro de Saúde Olenka Macelaro	2°49'25.0"N 60°43'08.2"W	X	X
Policlínica Cosme e Silva	2°48'30.8"N 60°44'37.0"W		X
Centro de Referência de Especialidades Mecejana	2°49'24.3"N 60°41'35.7"W		X
Centro de Saúde Pastor Luciano Galdino Rabelo	2°47'44.4"N 60°43'09.4"W		X
Centro de Saúde Bairro São Pedro	2°49'29.1"N 60°39'44.4"W		X
Hospital Geral de Roraima	2°49'59.9"N 60°41'22.4"W	X	
Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima	2°49'53.6"N 60°41'27.3"W	X	
Hospital Lotty Iris	2°48'50.5"N 60°40'07.7"W	X	
Hospital Unimed	2°48'58.7"N 60°40'53.5"W		X
Clínica Especializada Coronel Mota	2°49'28.3"N 60°40'16.9"W		X

Quanto aos nomes dados aos isolados, seguiu-se como padrão, as iniciais (prefixo) dos locais de coleta e em seguida um sufixo relacionado ao substrato, por exemplo: coletas realizadas para excretas de pombo e solo nas proximidades do Centro de Saúde Olenka Macelaro recebeu os códigos, CSOM – PB1 e CSOM – SL01, respectivamente.

4.3. Padronização inicial dos métodos, meios de cultura e utilização de cepas padrão:

Os meios de cultura utilizados para esta pesquisa foram produzidos no Laboratório Multidisciplinar V de Práticas Biomédicas do Claretiano Centro Universitário em Boa Vista no Laboratório de Micologia do Centro de Estudos da Biodiversidade da Universidade Federal de Roraima.

O preparo dos meios de cultura se deu em diferentes momentos. Na ocasião, foram utilizados meios comerciais, como Ágar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol (ASC), Ágar Mueller-Hinton (AMH) e Ágar Uréia de Christensen (AUC). Os meios Ágar Semente de Níger (NSA) e Ágar Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB) foram preparados utilizando-se os componentes das fórmulas de acordo a literatura e metodologias indicadas.

Todos os meios foram submetidos a controles microbiológicos de preparo, por meio do isolamento de uma placa ou tubo do lote preparado e submetido à 37°C por 48 horas.

Para o controle de qualidade e controle positivo dos meios de cultura foram utilizadas cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 10231) *Cryptococcus neoformans* (H99) e *Cryptococcus gattii* (CFP60), sendo os isolados de *Cryptococcus* foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro.

Imagem 1 – Controle de qualidade do meio de ureia com cepas padrão



Fonte: o autor.

4.4. Armazenamento dos isolados da pesquisa

Após o término da pesquisa, considerando a confirmação das espécies dos isolados estudados, por meio do perfil fenotípico traçado para a identificação, bem como os resultados da susceptibilidade aos antifúngicos, os isolados foram transferidos para o meio ASC e, após crescimento por 48 horas a temperatura ambiente, um apanhado da massa celular foi dissolvido em leite desnatado estéril e agitado vigorosamente por cinco minutos em agitador mecânico (Vórtex) e armazenado em refrigerador (-20°C) para preservação dos isolados no Laboratório Multidisciplinar V de práticas Biomédicas do Claretiano Centro Universitário.

4.5. Processamento de excremento de pombos e poeira do solo próximos aos estabelecimentos de saúde

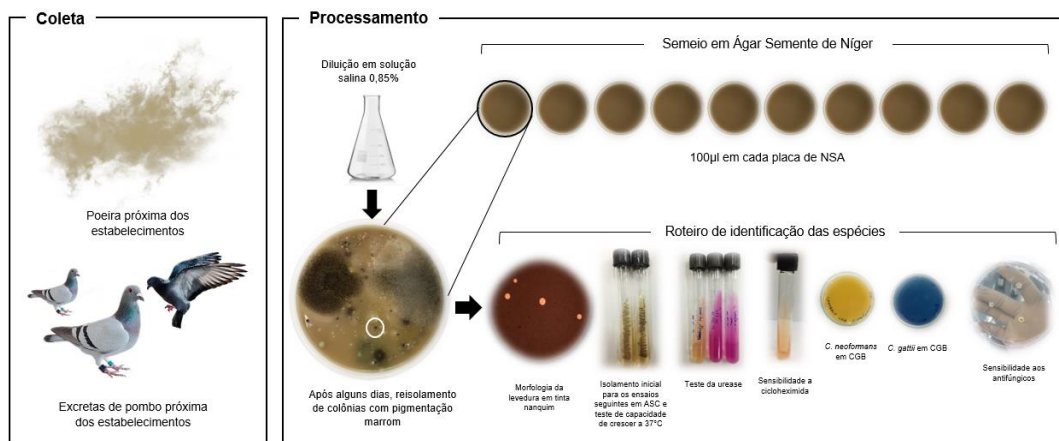
O processamento dos substratos de excremento de pombos e poeira do solo se deu por meio da metodologia adaptada de Lázera e colaboradores (1996; 2000); e Granados e Castañeda (2005), que consiste em suspender 1g do material coletado em 50ml de soro fisiológico estéril, acrescido de 0,2-1,1g de cloranfenicol em Erlemeyer. Em seguida o material foi agitado continuamente por 5 minutos em agitador tipo Vórtex e após 30 minutos em repouso, alíquotas

de 100µl foram semeados em NSA. Ao total, foram semeados 1000µl da suspensão em 10 placas de NSA (100 µl/placa).

Os excrementos de pombos e a poeira foram coletados nas proximidades dos estabelecimentos em três pontos diferentes, cada ponto foi considerado como uma amostra. As coletas foram realizadas em época de seca, com temperaturas que variavam em média de 35,2 a 37,4°C e umidade relativa de 45,1%. Para cada amostra a suspensão foi semeada em 10 placas. Num total, cada local de coleta resumiu-se em três amostras e por fim 30 placas de NSA semeadas.

Todas as placas foram mantidas em temperatura ambiente (25-35°C) por até 7 dias. Por padrão metodológico, todas as colônias que apresentavam coloração ou pigmentação marrom foram isoladas em ASC e submetidas aos procedimentos para identificação fenotípica. Os procedimentos de coleta e identificação dos isolados estão claramente ilustrados no esquema 1.

Figura 2 – Metodologia de coleta e processamento dos substratos utilizada para a identificação fenotípica dos isolados provenientes dos pontos de coleta



Fonte: o autor.

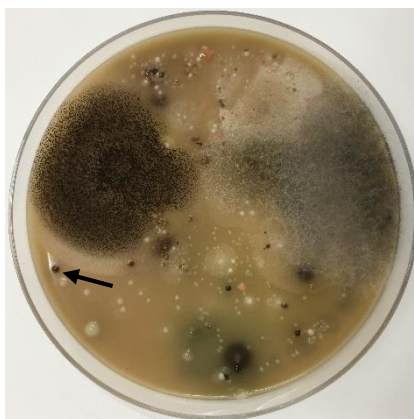
4.6. Identificação dos isolados por meio de critérios fenotípicos

4.6.1. Morfologia da cultura suspeita pela Tinta Nanquim e Gram

O estudo microscópico da cultura suspeita foi realizado com auxílio da tinta nanquim. Os isolados em NSA suspeitos de *Cryptococcus* (imagem 2) foram

repicados em ASD e submetidos a análise microscópica com a tinta da china. Assim como a análise com a tinta da china, o Gram foi utilizado para reforçar a caracterização morfológica das cepas. Essas análises preliminares introdutórias, permitiram comparar as colônias provenientes de isolamentos suspeitos com os isolados padrão e equiparação morfológica dos mesmos diante da análise visual das leveduras.

Imagem 2 – semeio de amostra em meio NSA contendo colônia sugestiva de *Cryptococcus* (seta)



Fonte: o autor.

4.6.2. Ensaio para estudo da atividade da fenoloxidade

Após o isolamento das colônias características e crescimento em ASC, uma UFC (Unidade Formadora de Colônia) foi semeada em NSA (10g glicose, 780mg creatinina, 200mL extrato de semente de níger (*Guizottia abyssinica*), 20g ágar bacteriológico, 800mL água destilada) e observou-se o crescimento e pigmentação das colônias após 48 horas de incubação a 28°C (SIDRIM, 1995). Para o controle de funcionamento do meio, foram utilizadas cepas padrão de *C. neoformans* como controle positivo e de *Candida albicans* (ATCC 10231) como controle negativo.

4.6.3. Ensaio para estudo da atividade da urease

Para o estudo da atividade da urease, uma UFC foi repicada em ágar ureia de Christensen (inclinado) e incubada a temperatura de 28°C pelo

período de 48 a 72 horas. A reação positiva foi indicada pelo aparecimento de cor rosa no meio de cultura devido a degradação da ureia a amônia, o que alterou o indicador de pH para alcalino. Quando inalterada a cor do meio, a prova foi considerada negativa (CHRISTENSEN, 1946; COX et al., 2000).

4.6.4. Habilidade de crescimento a 37°C

A habilidade de crescimento a 37° foi verificada durante o primeiro repique das amostras onde uma UFC (Unidade Formadora de Colônia) foi repicada em ASC onde o desenvolvimento indicou termotolerância após incubação pelo período de 48 a 72 horas (LARONE et al., 2002).

4.6.5. Ensaio para estudo da sensibilidade a Cicloheximida

A cicloheximida é um inibidor da síntese de proteínas, em eucariotos produzida pela bactéria *Streptomyces griseus*. A cicloheximida exerce o seu efeito interferindo na etapa de translocação durante a síntese proteica bloqueando a tradução. Tradicionalmente a sensibilidade a cicloheximida é verificada adicionando-a ao meio ágar Sabouraud. Após semeados em meio de ágar Sabouraud com Cicloheximida, o desenvolvimento foi observado entre 24-48h (KONEMAN, et al., 2008).

4.6.6. Determinação da identidade taxonômica por CGB

Considerado meio padrão para diferenciação de *C. neoformans* e *C. gattii*, foi utilizado o Ágar Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB) (KWON-CHUNG et al., 1982). Os isolados suspeitos de *Cryptococcus* foram semeados em CGB e incubados a 28°C por 48 horas. Considerado um processo intrínseco e natural, *C. gattii* é resistente a L-Canavanina, análogo da L-arginina, presente no meio, além de indicar a metabolização da L-canavanina e utilização de glicina cujos produtos alcalinos alteraram o pH do meio identificando *C. gattii*, quando o mesmo perde sua cor natural amarelo e passa a azul cobalto. *C. neoformans* foi identificado quando não houve

alteração na cor do meio, pois sabe-se da sua incapacidade de crescer na presença de L-canavanina.

4.6.7. Teste de susceptibilidade a antifúngicos por disco difusão

É importante mencionar que é grande o número de infecções fúngicas invasivas bem como a introdução de novos fármacos e conjugações aos tratamentos dessas infecções, em paralelo é possível observar, mesmo que timidamente, relatos de resistência aos antifúngicos ao redor do mundo por meio dos estudos de diversos pesquisadores (ARIKAN et al., 2000; REX et al., 2001; SILVA et al., 2010).

Esta pesquisa considerou a experiência de outros estudos para a escolha do meio de cultura utilizado para os testes de susceptibilidade. Diversos estudos mostraram não haver diferença significativa na atividade fúngica frente aos fármacos utilizados para os ensaios de susceptibilidade a antifúngicos no qual utilizou-se o meio Mueller-Hinton ao MOPS-RPMI (TOTI-RODRIGUES, 2008; RADETSKY et al., 1986).

No que se refere aos discos de antifúngicos utilizados para determinar o perfil de susceptibilidade, foram utilizados discos do fabricante CECON, bem como os critérios de análise do próprio fabricante (quadro 1), uma vez que estudos anteriores demonstraram altos índices de confiança para essa esses discos em comparação a outros (MATOS, 2011).

Quadro 1 – Critérios para análise de teste de sensibilidade para *Cryptococcus* por disco difusão segundo o fabricante CECON

Antifúngicos	Simbolo	Conc./ Disco	Zona de Inibição (mm)	CIM mcg/mL	Interpretação
5-Fluorocitosina	5 FC 1	1 mcg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 25 > 25	Sensível Intermediário Resistente
Anfotericina B	AB	100 mcg	> 10 ≤ 10	< 1 ≥ 1	Sensível Intermediário ou Resistente
Nistatina	NY	100 U.I.	> 10 -- ≤ 10	-- -- --	Sensível -- Resistente
Econazol	EC	50 mcg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	Sensível Intermediário Resistente
Clotrimazol	CTR	50 mcg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	Sensível Intermediário Resistente
Miconazol	MCZ	50 mcg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	Sensível Intermediário Resistente
Ketoconazol	KET	50 mcg	> 20 20 - 10 < 10	< 1,56 1,56 - 6,4 > 6,4	Sensível Intermediário Resistente
Fluconazol	FLU	25 mcg	≥ 19 18 - 15 ≤ 14	≤ 8 32-16 ≥ 64	Sensível Intermediário Resistente
Itraconazol	ICZ	10 mcg	≥ 20 19 - 12 ≤ 11	-- -- --	Sensível Intermediário Resistente

Fonte: CECON, 2014.

A metodologia padrão utilizada para os ensaios de sensibilidade foi realizada pela técnica em disco difusão frente aos antifúngicos fluconazol (25 µg) e anfotericina B (100 µg) (CECON). Em capela de fluxo laminar foram utilizadas placas de Petri (15x90mm) contendo ágar Mueller-Hinton modificado (2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno) com espessura de quatro milímetros e pH 7,2 (pHgâmetro Digital). As culturas testadas foram preparadas 48 horas antes do ensaio em meio ASC. Foi retirada massa celular e realizou-se suspensão em solução salina 0,85% estéril, o preparado seguiu o padrão de turbidez 0,5 McFarland. Com auxílio de swab estéril foram feitos semeios na superfície do meio em estrias sobrepostas em cinco diferentes direções. Após 15 minutos, os discos contendo fluconazol (25µg) e anfotericina B (100 µg) foram assepticamente dispensados e as placas foram incubadas em temperatura ambiente (27°C aproximadamente) por 48 horas. Após esse período a leitura dos halos foi medida em milímetros de diâmetro conforme padrão do fabricante (imagem 3).

Imagem 3 – Placa de Ágar Mueller-Hinton com semeio de *C. neoformans* e discos de antifúngicos (Anfotericina B e Fluconazol) para ensaio de susceptibilidade



Fonte: o autor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e caracterização dos agentes da criptococose

A criptococose continua sendo um importante desafio para as autoridades em saúde, bem como para os profissionais que atuam na prática clínica em decorrência da sua elevada gravidade tanto em hospedeiros imunocompetentes quanto em imunodeprimidos. Nesse contexto, é indispensável reconhecer que, para o avanço da melhoria da atenção em criptococose, é necessário ampliar o conhecimento epidemiológico, clínico acerca da doença e sobretudo da distribuição desses agentes na natureza.

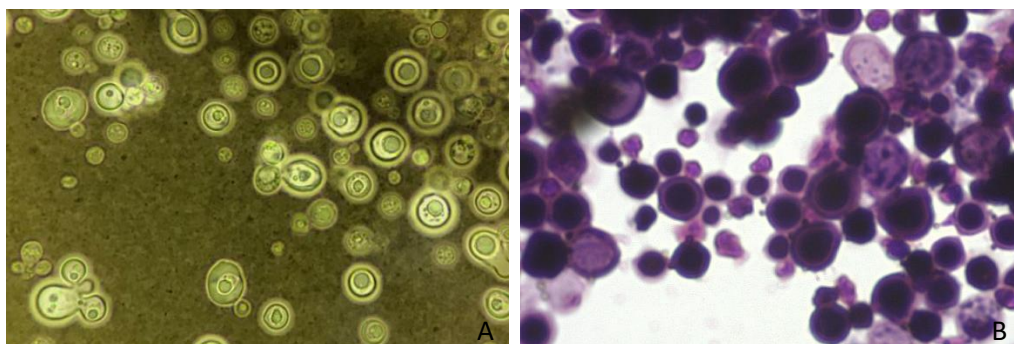
A criptococose e seus agentes tem sido intensamente estudada no decorrer das últimas décadas em virtude do advento da SIDA, o que provocou

um aumento drástico das infecções oportunistas entre as quais a criptococose, notadamente a causada por *C. neoformans*. Diversas investigações (CASALI et al., 2003; IGREJA et al., 2004; LAZÉRA et al., 1998; KWON CHUNG; BENNETT, 1992; LAZERA et al., 2005, FORTES, 2001) têm sido reportadas contribuindo para melhoria na compreensão do comportamento eco-epidemiológico de ambos agentes: *C. neoformans* e *C. gattii*, embora muitos aspectos de sua ecologia, mecanismo de infecção, fatores de virulência, sexualidade, resistência a antifúngicos ainda precisem ser mais explorados, afim de que um panorama global possa se desenhar.

Após o processamento das amostras que compõem este estudo em NSA, um total de 15 colônias suspeitas, isto é com coloração marrom, supostamente fenoloxidase positivas e sugestivas de representantes de leveduras do complexo de espécies *C. neoformans* – *C. gatti* foram transferidas para ASD e foram submetidas aos testes descritos na metodologia deste trabalho, aquelas que não tinham características foram descartadas por conveniência ao tema e objetivo do trabalho.

Assim, as 15 culturas foram estudadas diante das suas características morfológicas com auxílio da tinta da china e pela coloração de Gram como prova de reforço (imagem 4). Dentre as 15 colônias inicialmente suspeitas, oito foram consideradas aptas aos testes bioquímicos, na qual, todas foram confirmadas como pretendentes a representantes do complexo de espécies *C. neoformans* – *C. gatti*

Imagem 4 – Exame direto da colônia com auxílio da tinta da china (A) e coloração de Gram (1000x) (B)



Fonte: o autor.

O primeiro ensaio realizado foi o da urease, onde colônias puras foram repicadas em meio ureia de Christensen e incubados a 30°C por 24-48 horas. Nesta reação, observou-se a hidrólise da ureia com produção de amônia e alcalinização do meio, causando alteração do indicador de pH de neutro para básico, evidenciando-se, assim, uma coloração de tom róseo intenso, classificada como urease positiva, ou seja, representa a presença de *Cryptococcus spp* (Imagem 6). A partir desse momento, das 15 colônias, oito foram urease positivo.

Imagem 5 – Ensaio de atividade da uréase, evidenciando a mudança de cor do meio pela acidificação pela atividade da enzima



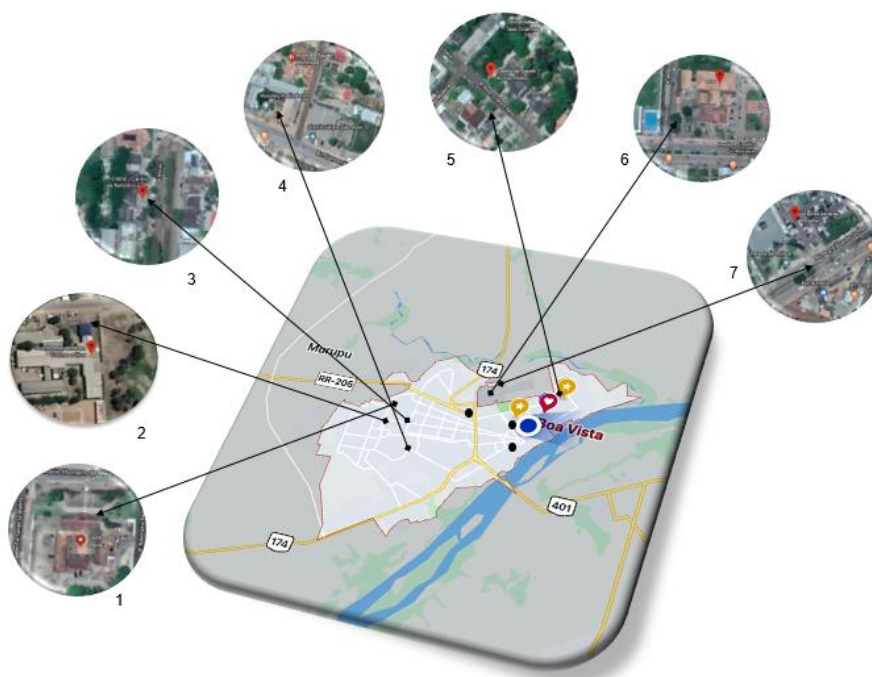
Fonte: o autor.

O segundo teste aplicado, foi o da termotolerância e sensibilidade a cicloheximida, onde as cepas foram submetidas a dois meios de cultura: o ágar Sabouraud (2%) e o ágar Sabouraud acrescido de cicloheximida. Ambos os meios foram dispostos a temperatura de 37°C por até 48 horas. Todas as cepas cresceram a 37°C e apresentaram-se sensíveis a cicloheximida. Nesse momento, consideramos uma questão muito importante, quando ao crescimento a 37°C, pois, apenas *C. neoformans* e *C. gattii* tem essa capacidade, habilidade diretamente relacionada ao potencial de disseminação do isolado fúngico no organismo do hospedeiro (PETIT, et al., 2010). O fato de esses isolados terem sido encontrados nas proximidades dos estabelecimentos de saúde, possibilita interpretar a respeito do risco de aquisição da doença, uma vez que há o encontro de dois fatores importantes para o desenvolvimento da Criptococose, a presença da levedura no ambiente e dos potenciais hospedeiros.

Do total de 15 colônias sugestivas para os agentes da Criptococose, 8 foram confirmados como pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, sendo, 4 isolados para *C. neoformans* provenientes de amostra de solo, 3 para amostras de excretas e 1 *C. gattii* advindo de amostra de solo (gráfico 1 e tabela 4).

Uma primeira análise dos resultados aponta que dos 10 estabelecimentos de saúde que compõem este estudo, sete apresentaram agentes da criptococose (Figura 2) em pelo menos um dos substratos investigados (Tabela 2). Estes dados representam 70% de positividade e refletem a facilidade de isolamento do fungo no ambiente nas proximidades dos estabelecimentos de saúde em Boa Vista/RR.

Figura 3 – Locais de coleta que apresentaram positividade para os agentes da criptococose nos substratos pesquisados



Locais coletados sem positividade (3); Locais com amostras positivas (7/10). Centro de Saúde Olenka Macelaro (1), Policlínica Cosme e Silva (2), Centro de Referência de Especialidades Mecejana (3), Centro de Saúde Pastor Luciano Galdino Rabelo (4), Centro de Saúde Bairro São Pedro (5), Hospital Geral de Roraima (6), Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima (7).

Fonte: o autor

Tabela 2 – Número de amostras positivas por substrato dos isolados dos agentes da criptococose obtidos de excretas de pombo (PB) e solo (SL) nas proximidades de estabelecimentos de saúde em Boa Vista/RR

LOCAL (proximidades)	Nº DE AMOSTRAS	Nº DE AMOSTRAS POSITIVAS POR SUBSTRATO
-------------------------	-------------------	---

	POSITIVAS/ ESTUDADAS	EXCRETA	SOLO
Prox. Centro de Saúde Olenka Macelaro	2/6	1	1
Prox. Policlínica Cosme e Silva	1/3	NE	1
Prox. Centro de Referência de Especialidades Mecejana	1/3	NE	1
Prox. Centro de Saúde Pastor Luciano Galdino Rabelo	1/3	NE	1
Prox. Centro de Saúde Bairro São Pedro	1/3	NE	1
Prox. Hospital Geral de Roraima	1/3	1	NE
Prox. Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima	1//3	1	0
Prox. Hospital Lotty Iris	0/3	0	NE
Prox. Hospital Unimed	0/3	NE	0
Prox. Clínica Especializada Coronel Mota	0/3	NE	0
TOTAL	8/33	3	5

NE = não estudado

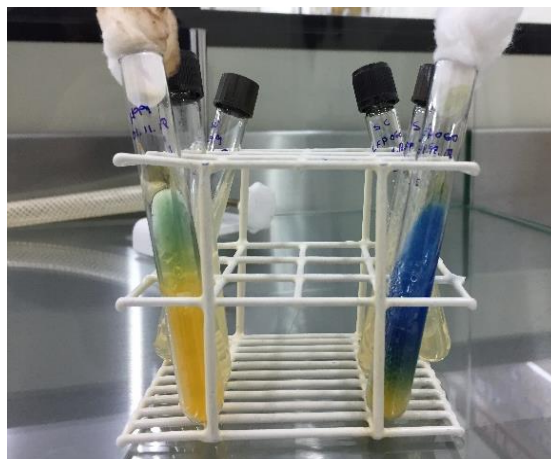
Fonte: o autor.

De acordo com os dados das Tabelas 1 e 2, verifica-se que foram isolados os agentes da criptococose em 3/12 amostras de excretas de pombos (25%) e 5/21 amostras de poeira do solo (23,8%). Ressalta-se que a densidade do fungo, representada pelo número de unidades formadoras de colônias foi de 50 para cada uma das amostras positivas, o que refletiu no isolamento de apenas uma colônia por amostra.

Para determinar a identidade taxonômica dos isolados, isto é, diferenciar *C. neoformans* e *C. gattii*, realizou-se o teste em meio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol), ilustrado na imagem 7, como proposto por Kwon-Chung e colaboradores (1982). Sabe-se que *C. gattii* é naturalmente resistente a canavanina, logo utiliza a glicina como fonte de carbono e nitrogênio, promovendo alteração do pH e evidenciando uma coloração azul-cobalto,

enquanto que *C. neoformans*, por ser sensível à presença da canavanina, não se desenvolve, deixando o meio da cor original.

Imagem 6 – Teste de sensibilidade a canavanina em meio CGB



Fonte: o autor.

De acordo com os dados da tabela 2 e da tabela 3 verifica-se que foi possível isolar *C. neoformans* em 3/12 amostras de excretas de pombos, o que representa 25% de positividade. Por outro lado, nas amostras de poeira do solo, *C. neoformans* esteve presente em 4/21 e *C. gattii* em 1/21, representando 19% e 4,76% respectivamente. Em comparação aos números desse trabalho estudos realizados em Belém (Pará), Costa (2008) isolou tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* de amostras proveniente de diferentes substratos (10/186). No Amazonas, Brito-Santos e colaboradores (2015) isolaram *C. gattii* em amostras de poeira (2/51).

Vale ressaltar que nesse estudo foi possível isolar inclusive *C. neoformans* e *C. gattii* em solo e excretas de pombo nas proximidades do Centro de Saúde Olenka Macelaro. Apesar de coletado sem contaminação aparente por excrementos de pombos, foi possível perceber a presença de contaminantes em diferentes pontos próximos ao local das coletas.

Tabela 3 – Caracterização bioquímica dos isolados por substrato para os isolados dos agentes da criptococose obtidos de excretas de pombo (PB) e solo (SL) nas proximidades de estabelecimentos de saúde em Boa Vista/RR

Local (proximidade)	Isolados	Caracterização bioquímica
------------------------	----------	------------------------------

Centro de Saúde Olenka Macelaro	CSOM – PB01	<i>C. neoformans</i>
	CSOM – SL01	<i>C. neoformans</i>
Policlínica Cosme e Silva	PCS – SL02	<i>C. neoformans</i>
Centro de Referência de Especialidades Mecejana	CREM – SL03	<i>C. neoformans</i>
Centro de Saúde Pastor Luciano Galdino Rabelo	CSPL – SL04	<i>C. gattii</i>
Centro de Saúde Bairro São Pedro	CSBSP – SL05	<i>C. neoformans</i>
Hospital Geral de Roraima	HGR – PB02	<i>C. neoformans</i>
Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima	LCSPRR – PB03	<i>C. neoformans</i>

Fonte: o autor.

Fortes et al (2001) registraram o primeiro isolado de *C. gattii* de origem ambiental na região Norte, o mesmo foi isolado a partir de *Guetarda acreana*, em uma área de mata sem ação antrópica na Ilha de Maracá no Estado de Roraima.

Outros estudos revelaram a presença de *C. gattii* em ambientes próximos a casas, isolados em poeira (BRITO-SANTOS, 2015). Embora a maioria dos estudos relatarem o isolamento de *Cryptococcus* em ambientes fechados e com propensão a contaminação por excretas de pombos (AJELLO, 1956; AJELLO, 1958; MACHADO et al., 1993; CURO et al., 2005; BARONI et al., 2006), o presente estudo trouxe uma nova perspectiva. O isolado de poeira coletada nas proximidades do Centro de Saúde Pastor Luciano Galdino Rabelo no bairro Centenário (imagem 7) é o único *C. gattii*. Esse dado é relevante para os estudos da Criptococose em Roraima, uma vez que outros estudos têm isolado *C. gattii* em poeira domiciliar, incluindo estudos realizados no interior do Amazonas e em Belém (BRITO-SANTOS, et al., 2015; GLEICA, 2016; COSTA, 2008). Ainda é possível considerar que a infecção ocorre por inalação de propágulos de origem ambiental (LEVITZ, 1991) a partir de locais contaminados por fezes secas ou pela ingestão de poeira (CASADEVALL; PERFECT, 1998). O isolamento deste *C. gattii* nas proximidades de um posto de saúde, além de ser uma via de tráfego de pessoas, especialmente aquelas que frequentam a unidade de saúde, nos faz atentar-se para os riscos de aquisição da doença.

Imagem 7 – Local de coleta do isolado identificado como *C. gattii* nas proximidades do Centro de Saúde Pastor Luciano Galdino Rabelo no bairro Centenário



Fonte: o autor.

O isolamento de *C. neoformans* e *C. gattii* compartilhando o mesmo ambiente (oco de árvore) foi registrado pela primeira vez em Teresina (Piauí) em *Cassia grandis* (LAZERA et al., 2000). Em nosso estudo, foi possível encontrar *C. neoformans* em amostras de excretas de pombo e de solo, esse dado sugere possível elo entre seus ciclos biológicos na natureza, bem como, possíveis formas de dispersão do fungo, uma vez que no local haviam, além de abrigo para pombos, também árvores, frequentemente relatados na literatura como fonte para ambas as espécies. Esse achado reforça o que Fortes (2001) descreveu, quando relatou o isolamento de ambas as espécies a partir de oco de *Adenanthera pavonina*, em Boa Vista (Roraima).

Estes achados não têm sido relatados na literatura, chamando atenção para que estes achados tenham sido observados nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, as quais tem demonstrado diferenças epidemiológicas reveladas pela elevada prevalência de *C. gattii*, tanto para isolados de amostras ambientais

quanto nessas regiões (CORREA et al., 1999; CAVALCANTI, 1997; MARTINS, 2003, NISHIKAWA et al. 2003).

Roraima está localizada no extremo norte do Brasil, com temperaturas altas e clima predominantemente tropical. Durante o período das coletas (janeiro a abril de 2019) as temperaturas medidas nos locais variaram entre 24,7 (mínima) a 39.1°C (máxima), conforme tabela 5. De acordo com Beheregaray e colaboradores (2005), temperaturas superiores a 30°C, diminuiria a viabilidade da levedura no ambiente. Esse dado não se mostrou significativo quando percebemos que em Boa Vista, as temperaturas médias mínimas (tabela 5), no momento da coleta, estiveram a cima de 30°C. Mesmo assim foi possível isolar e identificar crescimento puro e exuberante logo nos primeiros isolamentos.

Tabela 4 – Dados meteorológicos do período das coletas

MÊS	TEMP. MÉDIA MAX	TEMP. MÉDIA MIN	UMIDADE RELATIVA/MÉDIA
Janeiro	24,7	35,2	49,2
Fevereiro	24,8	35,9	45,1
Março	25,5	37,4	41,0
Abril	26,3	37,1	40

Fonte: o autor.

Quanto as características físicas dos locais de coleta, foi possível observar que 40% apresentavam indícios de colonização por pombos. Desse total, 20% foram positivos para isolamento de *Cryptococcus neoformans*. Dos locais que não foi possível coletar amostras de excretas, observamos que haviam sido limpos recentemente (60%), o que nos faz acreditar que há um trabalho de contenção da população dessas aves por parte dos estabelecimentos de saúde.

Um fato que chamou atenção a respeito da forma como as excretas eram eliminadas dos locais foi que, num dos locais de coleta, foi possível ver um funcionário varrer a seco as fezes de pombo para retirá-las da calçada. Outro ponto curioso a respeito da contenção da população dos pombos por parte dos estabelecimentos de saúde, é que foi possível ver telas instaladas nos telhados para evitar abrigo para as aves (20%).

É importante elucidar que boa parte dos locais investigados haviam proteções contra habitação de pombos e/ou eram limpos frequentemente, uma vez que foram feitas pelo menos três visitas em cada um dos locais na qual não havia sido possível coletar material anteriormente.

Esse estudo revelou presença de *C. neoformans* em 50% das amostras de solo dos locais estudados. Esses dados são relevantes e permeiam aos encontrados no curso histórico do isolamento desses agentes, uma vez que em 1954, Emmons isolou 20 cepas de *C. neoformans* de 1.751 amostras de solo, um total de 1,14% de positividade para esse estudo.

A presença de *C. neoformans* é bem documentada e tem sido isolado da maioria dos casos de SIDA no Brasil (ROZENBAUM et al., 1992, CASALI et al., 2003) e no mundo (MITCHELL; PERFECT, 1995; BICANIC; HARRISON, 2005). Os isolados de *C. neoformans* de solo desse estudo mostram concordância com literatura mundial que relata a ocorrência deste em amostras clínicas e ambientais (KWON-CHUNG; BENNETT, 1978).

Em 2016, Gleica revelou uma porcentagem de 11,3 para isolamento positivo dos agentes da Criptococose provenientes de poeira peridomiciliar em comunidade em Iranduba, Amazonas. Esses dados, apesar de variados, tem relevância significativa, uma vez que é possível encontrar possíveis alvos de infecção, especialmente se tratando de estabelecimentos de saúde com fluxo significativo de clientes, como revela esse estudo.

5.2. Ensaios de susceptibilidade aos antifúngicos

Tradicionalmente a terapêutica para a criptococose em humanos consiste em primeiro lugar com Anfotericina B, podendo estar ou não associada a 5-Fluorocitocina, sendo quase sempre mantida com Fluconazol e outros azóis. Considerando esse fato, esse estudo utilizou esses dois fármacos para os ensaios de susceptibilidade.

Quanto aos estudos de susceptibilidade ao Fluconazol e Anfotericina B, foi possível observar que todos os isolados de *C. neoformans* foram sensíveis aos antifúngicos, todas as cepas apresentaram sensibilidade dentro dos padrões disponibilizados pelo fabricante e estão registrados na tabela 6. Esse dado

mostra semelhança aos isolados do estudo de Cardoso (2012) na qual, todos os isolados, clínicos e ambientais, apresentaram sensibilidade (100%) a anfotericina B, Fluconazol, itraconazol, cetoconazol, voriconazol e posaconazol. O isolado de *C. gattii* (CSPL – SL04) desse estudo, foi o único que demonstrou aparente resistência ao fluconazol. Isso provavelmente está relacionado a enzima lacase (fenol oxidase) produz melanina. A melanina é produzida através da PKA (proteína quinase A) e se deposita no interior da parede da levedura, tem a característica da insolubilidade e da resistência a substâncias químicas e enzimas (TAKAHARA, 2011).

O ensaio foi repetido para confirmação. Em meio de ASC e MH foram semeados por estriamento em 5 direções e por inundação e dispostos os discos de antifúngicos após 20 minutos para difusão e leitura posterior. Esse dado é condizente com o que se tem registrado na literatura. Gleica (2016) relatou presença de resistência de isolados de *C. gattii* ao Fluconazol. Em Roraima, esse é o primeiro estudo a relatar a resistência de isolados ambientais a antifúngicos.

Conforme orientação do fabricante, fizemos o ensaio com as duas metodologias disponíveis na ficha técnica dos discos. A primeira consiste na tradicional utilizada também para os ensaios em bacteriologia em Ágar Mueller-Hinton. A segunda, consiste em usar Ágar Sabouraud, na qual a diluição (0,5 – MacFaland) é disposta sob o meio por inundação. Nesse momento foram testados Anfotericina B (100mcg), Fluconazol (10mcg) e acrescentamos Itraconazol (10mcg). Ambos os testes apresentaram resistência total ao fluconazol (imagem 9).

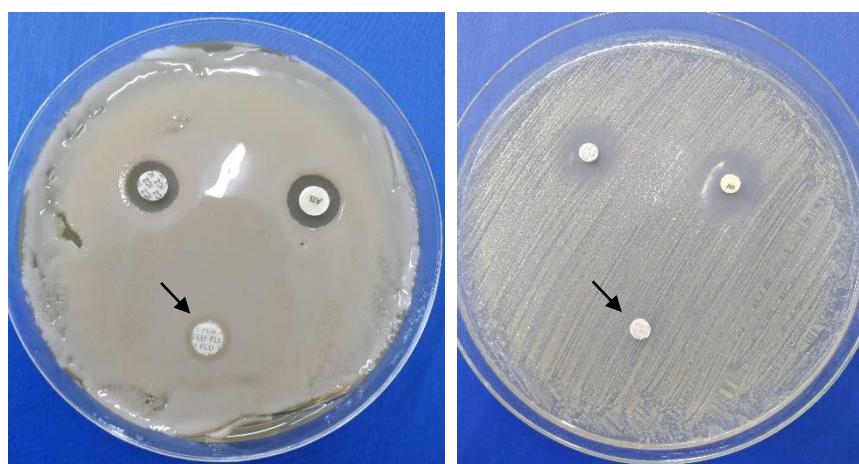
Tabela 6 - ensaios de susceptibilidade ao Fluconazol (FLU) e Anfotericina B (AB) por disco difusão de isolados dos agentes da criptococose obtidos de excretas de pombo (PB) e solo (SL) nas proximidades de estabelecimentos de saúde em Boa Vista/RR

Isolado	Resultado dos antifúngicos testados		
	FLU (25mcg)	AB (100mcg)	Resultados
CSOM – PB01	23mm	12mm	Sensível
CSOM – SL01	20mm	17mm	Sensível
PCS – SL02	19mm	16mm	Sensível
CREM – SL03	20mm	18mm	Sensível
CSPL – SL04	0mm	10mm	Resistente (FLU)
CSBSP – SL05	21mm	13mm	Sensível
HGR – PB02	19mm	11mm	Sensível
LCSPRR – PB03	22mm	15mm	Sensível

S: sensível, I: intermediário, R: resistente, I/R: intermediário ou resistente.

Fonte: o autor.

Imagem 9 – Teste de confirmação para resistência do isolado de *C. gattii* ao Fluconazol (FLU) em teste utilizando as metodologias de inundação e semeio padrão com os meios ASD e AMH, respectivamente



Fonte: o autor.

Vários trabalhos têm avaliado o perfil de susceptibilidade antifúngica, demonstrando preocupação crescente com o comportamento dos microrganismos isolados de amostras clínicas e ambientais (TRILLES et al., 2004; HORTA et al., 2005; SOUZA et al., 2005; PEDROSO et al., 2006; TAY et al., 2006; KHAN et al., 2007; THOMPSON et al., 2009; CHONG et al., 2010; VARMA et al., 2010; CICHON et al., 2011; MATOS et al., 2012; SILVA et al., 2012; TRPKOVIC et al., 2012). Levando-se em consideração que no presente estudo esse isolado foi o único que apresentou resistência e que foi o único isolado de *C. gattii*, nos faz refletir a respeito da diversidade desses agentes nos diferentes substratos no Estado de Roraima. Nesse momento, é importante reconhecer a existência de variabilidade genética e uma vez que esse fato pode traduzir-se em variabilidade fenotípica, tais como diferenças antigênicas, virulência e até mesmo na susceptibilidade aos agentes antifúngicos (FRANZOT et al., 1997).

Há também dados a respeito de resistência a azóis devido ao aumento da população com SIDA durante o tratamento de candidíase orofaríngea com o uso de azóis tais como o Fluconazol (PERFECT; CASADEVALL, 2002). Porém, os estudos que retratam a resistência de isolados ambientais são escassos. Em geral, pode-se pensar que fungos podem ser intrinsecamente resistentes a antifúngicos, configurando a resistência primária, como no caso das equinocandinas, que exibem previa resistência a *C. neoformans* ou desenvolver resistência em resposta a exposição a droga durante o tratamento (PEREA; PATTERSON, 2002). Porém, essa resistência não tem sido relatada com frequência na literatura atual. Os estudos a respeito do perfil de susceptibilidade devem se estender a um número muito maior de estados, regiões e países para que seja viável a compreensão de tal fenômeno ao nível global.

Roraima apresenta, não somente o clima, mas características ambientais diferentes dos demais estados brasileiros. Nesse contexto é possível perceber que na Região Norte, existe um padrão epidemiológico endêmico para *C. gattii*. Em comparação as condições ambientais, o Estado de Roraima é mais semelhante ao clima do país vizinho do que mesmo do restante do país.

Calvo e colaboradores (2001), analisaram cepas provenientes do Brasil, Chile e Venezuela e identificaram *C. gattii* resistente a 5-fluorocitosina, proveniente da Venezuela. Em 2008, Pérez e colaboradores fizeram um estudo

para compreender a distribuição dos agentes da criptococose na Venezuela e encontraram dados semelhantes aos brasileiros, 90,9% para *C. neoformans* e 9.1% para *C. gattii*.

Mais recentemente, Firacative e colaboradores (2016) relataram em seu estudo a nível nacional, que na Venezuela a criptococose representa 19% das infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, ficando em terceiro lugar, atrás da histoplasmose e paracoccidioidomicose, contexto semelhante ao brasileiro. *C. neoformans* aparece em 27% dos casos na média nacional. Os dados a respeito da susceptibilidade a antifúngicos desse mesmo estudo indicam resistência para as cepas de *C. gattii* ao Fluconazol (FIRACATIVE et al., 2016).

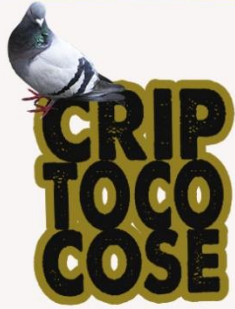


Nessa perspectiva, pode-se dizer que os dados encontrados na região norte do Brasil a respeito do isolamento dos agentes da criptococose e considerando ainda os dados de susceptibilidade na qual foi possível identificar *C. gattii* resistente a Fluconazol no Amazonas (GLEICA, 2016) e em isolado desse estudo, vão de encontro aos poucos dados encontrados no país vizinho, Venezuela. Levando a compreensão de comportamento semelhante entre os agentes da criptococose em seus ciclos biológicos na natureza.

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos e da análise e interpretação dos resultados desta pesquisa conclui-se que:

- a) É possível determinar a identidade taxonômica dos agentes da criptococose pelos métodos tradicionais de estudos fenotípicos.
- b) *C. neoformans* está presente com frequência em excretas de pombos em Boa Vista/RR, o que corrobora outros estudos.
- c) Tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* estão presentes na poeira do solo em Boa Vista/RR.
- d) *C. gattii* isolado da poeira do solo mostra-se resistente ao Fluconazol pelo método de disco difusão.
- e) Os estabelecimentos de saúde estudados, na cidade de Boa Vista, estão realizando ações de prevenção para evitar abrigo para pombos.
- f) É importante a divulgação e elaboração de procedimentos de limpeza, desinfecção e remoção de excretas de pombos em estabelecimentos de saúde.

7. ANEXO

O QUE É A CRIPTOCOCOSE?

A criptococose é uma doença causada por fungos leveduriformes presentes na natureza em diferentes substratos. Esse fungo é disperso na natureza e provavelmente todos os dias, inúmeras pessoas têm contato com ele, porém, pessoas com imunodepressão, tem mais propensão ao desenvolvimento da doença.

O fungo responsável pela criptococose é chamado de *Cryptococcus*. É possível encontrar dois tipos de *Cryptococcus* causando essa doença: *C. neoformans* e o *C. gattii*, são duas espécies diferentes do mesmo fungo que causam doenças, clinicamente diferentes.

ONDE PODEMOS ENCONTAR A LEVEDURA?

É muito comum o isolamento dos fungos causadores da criptococose em fezes de pombos, papagaios, bicos de aves, poeiras próximas de casas, ocas de arvores em praças publicas.

COMO ELA É TRANSMITIDA?



A transmissão da criptococose ocorre por meio da dispersão do fungo pelo ar. Fezes de pombos secas são possíveis fontes de contaminação pelo fungo. No momento em que o vento suspende as fezes, os propágulos do fungo podem ser inalados por indivíduos e a partir desse momento dar início ao processo de infecção.

COMO ELIMINAR OS RISCOS DE TRANSMISSÃO?

É muito comum ver casas, hospitais, escolas e postos de saúde utilizar diversas formas físicas para conter a proliferação de pombos nesses ambientes. Em nosso estudo, percebemos que em alguns estabelecimentos de saúde era utilizado telas para evitar os ninhos de novos pombos. Isso é excelente!!!

Porém, haviam locais onde era possível observar, não só a presença do pombo, como de suas fezes. É nesse momento em que o risco se instala. Como orientação básica de limpeza, sugerimos que os funcionários de limpeza, não varram o chão a seco. É importante evitar a suspensão de poeira vinda das fezes dos pombos secas.

Nossa sugestão é que: ao limpar, utilize água sanitária para umedecer e retirar as fezes com água em abundância e sem varrer. Claro que usar máscara e touca de proteção cai muito bem!!!

8. REFERÊNCIAS

ABEGG, MA. et al. **Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden.** Mycopathologia. 2006. v.161, 83-91 p.

AJELLO L. **Soil as natural reservoir for human pathogenic fungi.** Science. 1956.

BARNETT, JA. **A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, Cryptococcus neoformans.**Yeast, v.27, n.11, p.875-904, 2010.

BRITO-SANTOS et al. **Environmental Isolation of Cryptococcus gattii VGII from Indoor Dust from Typical Wooden Houses in the Deep Amazonas of the Rio Negro Basin.** Minnesota, United States. 2015.

CASADEVALL, A; PERFECT, J F. **Cryptococcus neoformans.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1999.44, 139 p.

CASALI, A K. et al. **Molecular typing of clinical and environmental Cryptococcus neoformans isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul.** 2003. FEMS Yeast Research 3 405-415 p.

CHAKRABARTI, A. et al. **Isolation of Cryptococcus neoformans var. gattii from Eucalyptus camaldulensis in India.** Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 1997. 35, n. 12, 3340-3342 p.

CICHON, M. et al. **Isolamento de Cryptococcus neoformans de amostras ambientais de Curitiba e região metropolitana (Paraná, Brasil) e testes de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas.** 2011. RBAC, v. 43, n. 3, 176-179 p.

COELHO, C. et al. **The Intracellular Life of *Cryptococcus neoformans***. Annu Ver Pathol. 2013.

CORREA, MPSC, et al. **Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil**. Rev Soc Bras Med Trop 1999. 32 (5) 505-508 p.

COSTA, S. P. S. E. **Isolamento e caracterização molecular de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de fontes ambientais na região metropolitana de Belém, Pará**. Tese (Doutorado em biologia parasitária). Belém, Pará. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2008. 161 p.

ELLIS, DH; PFEIFFER, TJ. **Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii***. J Clin Microbiol. 1990. v.28, 1642-1644 p.

FORTES, S. et al. **Neurocriptococose fatal em indiãgena do Estado de Roraima - Relato de caso**. IInd Congresso Brasileiro de Micologia. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Micologia, 2001. 94 p.

GLEICA, S. **Genotipagem de *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* e *C. GATTII* isolados de poeira domiciliar e avaliação da susceptibilidade a antifúngicos e da presença do antígeno em moradores de uma comunidade rural do Amazonas**. 2016.

KIDD, S. E. et al. **A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused cryptococosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada)**. Proc. Natl Acad Sci USA: 2004. v.101, 17258- 63 p.

KWON-CHUNG, K. J. BENNETT, J. E. **Distribution of alpha and alpha mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates.** Am J Epidemiol. 1978.

KWON-CHUNG, K.J; BENNETT, J.E. **Medical mycology.** Philadelphia, Lea & Febiger. 1992. 866 p.

KWON-CHUNG, Kyung J., et al. **Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae. (1557) Conservations in *Cryptococcus*.** p. 804–806. 2006.

KWON-CHUNG, Kyung J; VARMA, Ashok. **Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?** Stuart Levitz. 2006.

LAZÉRA, MS. et al. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

MACHADO, CC. et al. ***Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo.** Rev Inst Med Trop São Paulo. 1993. v.35, 77-79 p.

MARTINS, LMS. ***Cryptococcus neoformans* no Meio Norte do Brasil , Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz.** Rio de Janeiro. 2003. 87 p.

MAY, R.C. et al. ***Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen.** Nat Ver Microbiol. 2016. v.14, n.2,106-117 p.

MAZIARZ KE, PERFECT JR. ***Cryptococcosis*.** Infect Dis Clin N Am. 2016. v.30, 179-206p.

MEYER et al. **Molecular Typing of IberoAmerican**. *Cryptococcus neoformans* Isolates. Emerging Infectious Diseases. 2003.

MITCHELL T; PERFECT JR. **Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans***. Clin Microb Ver, p. 515-548, 1995.

MORETTI, M. L. et al. **Consenso em criptococose 2008**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, 2008.

PERFECT, Jr; CASADEVALL, A. ***Cryptococcus neoformans***. Washington: ASM Press, 1998.

POLACHECK, I. et al. **Improved Diagnostic Medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C)**. 1980. Laboratory of Clinical Investigation, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland 20205.

SANTOS, LO. et al. **Criptococose no estado do Amazonas: estudo de 75 casos diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical/FMT/IMTM Manaus, AM (1988-1998), Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz**. Rio de Janeiro, 2000. 154 p.

SILVA, BK. et al. **Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil**. Rev Iberoam Micol. 2012. v.29, n.1, 40-43 p.

ABEGG, MA. et al. **Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden.** Mycopathologia. 2006. v.161, 83-91 p.

AJELLO L. **Soil as natural reservoir for human pathogenic fungi.** Science. 1956.

AJELLO, L. **Occurrence of Cryptococcus neoformans in soils.** Am J Hyg, v.67, n.1, 72-77 p. 1958.

ARIKAN, S. et al. **Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species,** J Clin Microbiol. 1999. vol. 37,3946-51 p.

BARNETT, JA. **A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*.**Yeast, v.27, n.11, p.875-904, 2010.

BARONI, FA. et al. **Cryptococcus neoformans strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil.** Rev Inst Med Trop S Paulo. 2006. 71-75 p.

BERNARDO, H.M. et al. **Urban sources of *Cryptococcus* spp.** Lisboa (Portugal).Rev Port Med Vet. 2001. 96, 157-160 p.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia.** 4ª edição. Brasília. 2000.

BRITO-SANTOS et al. **Environmental Isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from Indoor Dust from Typical Wooden Houses in the Deep Amazonas of the Rio Negro Basin.** Minnesota, United States. 2015.

CASALI, A K. et al. **Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul.** 2003. FEMS Yeast Research 3 405-415 p.

CATTANA, ME. et al. **Native trees of the Northeast Argentina: Natural hosts of the *Cryptococcus neoformans*–*Cryptococcus gattii* species complex.** Rev Iberoam Micol. 2014. v.31, 188-192 p.

CERMEÑO, J. R. et al. ***Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* in dove's (*Columba livia*) excreta in Bolívar State, Venezuela.** Revista Latinoamericana de Microbiología.2006. v. 48, n. 1, 6-9 p.

CHAKRABARTI, A. et al. **Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India.** Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 1997. 35, n. 12, 3340-3342 p.

CHATURVEDI, V. et al. **Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*.** *Emerg Infect Dis.* 2010. v.16, n.1, p.

CHEN, S C A. et al. **Identification by random amplification of polymorphic DNA of a common molecular type of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in patients with AIDS or other immunosuppressive conditions.** J Infect Dis 1996. 173:754–8 p.

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

CICHON, M. et al. **Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de amostras ambientais de Curitiba e região metropolitana (Paraná, Brasil) e testes de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas.** 2011. RBAC, v. 43, n. 3, 176-179 p.

COELHO, C. et al. **The Intracellular Life of *Cryptococcus neoformans*.** Annu Ver Pathol. 2013.

COGLIATI, M. et al. **Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe.** Emerg Infect Dis. 2013. 18: 1618-16124 p.

CORREA, MPSC, et al. **Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil.** Rev Soc Bras Med Trop 1999. 32 (5) 505-508 p.

COSTA, S. P. S. E. **Isolamento e caracterização molecular de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de fontes ambientais na região metropolitana de Belém, Pará. Tese (Doutorado em biologia parasitária).** Belém, Pará. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2008. 161 p.

COX, G. M. et al. **Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*.** Mol Microbiol. 2001. 166-75 p.

CURO, M. et al. ***Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta, soil and air of palomares in the urban perimeter of ICA.** Rev Peruana Medicina Experimental y Salud Pública. 2005. 22:262–263 p.

CURRIE, BP; et al. **Restriction fragments length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeons excreta) and clinical sources in New York City.** J Clin Microbiol. 1994. 32:1188–92 p.

DHARMSHALE, SN. et al. **Disseminated cryptococcosis with extensive cutaneous involvement in AIDS.** Indian J Med Microbiol. 2006; 24:228-30 p.

EMMONS, CW. et al. **Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil.** J Bacteriol. 1955. v.62, n.6, 685-690p.

FILIU, W. et al. **Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.** 2002 Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 35(6):591-595 p.

FIRACATIVE, C. et al. **MLST and Whole-Genome-Based population analysis of *Cryptococcus gattii* VGIII links clinical, veterinary and environmental strains, and reveals divergent serotype specific sub-populations and distant ancestors.** PLoS Neglect. Trop. Dis. 2016.

WANKE, B. **First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest.** Mycoses. 2001.

FREIRE, AK. et al. **Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil.** Mycoses. 2012. v.55, n.3, 145-50 p.

GALANIS, S. et al. **Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA.** *Emerg. Infect. Dis.* 2007. 13:42–50 p.

GRANADOS, D P; CASTAÑEDA, E. **Isolation and Characterization of *Cryptococcus neoformans* Varieties Recovered from Natural Sources in Bogotá, Colombia, and Study of Ecological Conditions in the Area.** Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C. Colombia 2006.

HAGEN, F. et al. **Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii* *Cryptococcus neoformans* species complex.** *Fungal Genetics and Biology.* 2015. 78 (2015) 16–48 p.

HALLIDAY, T; et al. **Presence of and a mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia.** *J. Clin. Microbiol.* 2003. 37:2920–2926 p.

HERKERT et al. **Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in Developing Countries.** *J. Fungi*, 2017.

HERKERT, F. et al. **Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in Developing Countries.** 2017. *Jornal Fungi* 2017, 3, 62 p.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010.

ILLNAIT-ZARAGOZI et al. **Environmental isolation and characterisation of *Cryptococcus* species from living trees in Havana city.** Cuba: 2012. *Mycoses* v.55, n.3, e:138-144 p.

- KHAN, ZU. et al. **Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygium cumini* trees in north-western India.** J Antimicrob Chemother. 2007. v. 60, n. 2, 312–316 p.
- KIDD, S. E. et al. **A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada).** Proc. Natl Acad Sci USA: 2004.
- KONEMAN, E W. et al. **Diagnóstico Microbiológico.** Rio de Janeiro, Guanabara. Koogan S. A. 2001.
- KUROKAWA, CS. et al. **Virulence factors in fungi of systemic mycoses** *Revista do Instituto de Medicina Tropical.* São Paulo. 1998. 40:125-135 p.
- KWON-CHUNG, k J. et al. **Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae).** 2002.
- KWON-CHUNG, K. J. BENNETT, J. E. **Distribution of alpha and alpha mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates.** Am J Epidemiol. 1978.
- KWON-CHUNG, K.J; BENNETT, J.E. **Medical mycology.** Philadelphia, Lea & Febiger. 1992.
- KWON-CHUNG, KJ. **A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*.** 1975.

KWON-CHUNG, Kyung J., et al. **Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus*** Basidiomycota, Hymenomyces, Tremellomycetidae. (1557)

Conservations in *Cryptococcus*. 2006.

KWON-CHUNG, Kyung J; VARMA, Ashok. **Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?**

Stuart Levitz. 2006.

LACAZ C S, et al. **Tratado de Micologia Médica** 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LARONE, DH. et al. **Medical Important Fungi: a guide to identification.** 3 ed. Washigton: American Society for Microbiology. 2002.

LAZÉRA, et al. **Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by PCR-fingerprinting and RAPD.** 1999.

LAZÉRA, et al. **Population Genetic Analysis Reveals a High Genetic Diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII Population and Shifts the Global Origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid Desert in the Northeast of Brazil.** Todd B. Reynolds, University of Tennessee, UNITED STATES, 2016.

LAZÉRA, M S. et al. ***Cryptococcus neoformans* var. *gattii* – evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow.** Medical Mycology. 1998.

LAZÉRA, M. S. et al. **Criptococose – aspectos atuais. In: Micologia: avanços no conhecimento.** 5º Congresso Brasileiro de Micologia. 2007. 344-348 p.

LAZÉRA, MS. et al. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

LEECHAWENGWONGSGS, Manoon et al. **Primary cutaneous cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii* VGII in a tsunami survivor from Thailand.** Bangkok 10700, Thailand: Medical Mycology Case Reports. 2014, 31–33 2014 p.

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

LUGARINI, C.et al. ***Cryptococcus neoformans* isolated from Passerine and psitacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil.** *Mycopathologia,* v. 166, n. 2, p. 61-69, Aug, 2008.

MACEDO, R.C, et al. **Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns.** *J Clin Microbiol.* 2003. 41(1):73-7 p.

MACHADO, CC. et al. ***Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo.** *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1993. v.35, 77-79 p.

MARTINS, LMS. ***Cryptococcus neoformans* no Meio Norte do Brasil , Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz.** Rio de Janeiro. 2003. 87 p.

MATOS, CS. et al. **Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. In Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012. v. 31, n. 7, 1647-1652 p.

MATSUMOTO, M T. et al. **Genotipagem, sorotipagem e determinação de matingtipo de *Cryptococcus neoformans*.** Isolados clínicos do Estado de São Paulo, Brasil Rev Inst Med Trop São Paulo. 2007. 49 : 41 47 p.

MAY et al. **Environmental Isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from Indoor Dust from Typical Wooden Houses in the Deep Amazonas of the Rio Negro Basin.** 2015.

MAY, R.C. et al. ***Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen.** Nat Ver Microbiol. 2016. v.14, n.2, p.106-117 p.

MAZIARZ KE, PERFECT JR. ***Cryptococcosis*.** Infect Dis Clin N Am. 2016. v.30, 179-206p.

MEYER et al. **Molecular Typing of IberoAmerican. *Cryptococcus neoformans* Isolates.** Emerging Infectious Diseases. 2003.

MITCHELL T; PERFECT JR. ***Cryptococcosis* in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*.** Clin Microb Ver, p. 515-548, 1995.

MONTENEGRO, H; PAULA, CR. **Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil.** Proceedings 4th

International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis London, UK, September 12– 16. London: The Royal Society. 1999. 196 p.

MONTENEGRO, H; PAULA, CR. **Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of Sao Paulo, Brazil.** Med Mycol. 2000. 38: 385–390 p.

MORAES, EMP. PRÍMOLA NS; HAMDAN JS. **Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques.** Mycoses. 2003. v.46, n. 5-6, p.164-168 p.

MORETTI, M. L. et al. **Consenso em criptococose - 2008.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, 2008.

MURAKAWA, GJ. et al. **Cutaneous *cryptococcus* infection and AIDS.** Report of 12 cases and review of literature. Arch Dermatol. 1996:132-5 p.

NISHIKAWA, M.M. et al. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil; an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. Medical Mycology. 1998. v. 36, 305-311 p.

PAPPALARDO, MC. et al. **Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003. v. 45, n. 6, 299-305 p.

PARK BJ, et al. **Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS.** *AIDS*. 2009. p.525-530 p.

PASSONI, L.F.C et al. **WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M.; LAZÉRA, M.S. Cryptococcus neoformans isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil; an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis.** *Medical Mycology*. 1998. v. 36, 305-311 p.

PEREA, S.; PATTERSON, T.F. **Antifungal resistance in pathogenic fungi.** *Antimicrobial Resistance*. 2002. 15: 1073-1080 p.

PERFECT JR. **Cryptococcosis.** *Infect Dis Clin N Am*, 2016.

PERFECT, John. ***Cryptococcus neoformans: the yeast that likes it hot.*** Stuart Levitz, 2005.

PERFECT, JR. ***Cryptococcus neoformans: a sugar-coated killer with designer genes.*** *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005. v.45, n.3, 395-404 p.

PERFECT, Jr; CASADEVALL, A. ***Cryptococcus neoformans.*** Washington: ASM Press, 1998.

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

PFALLER, M. et al. **Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1992. v.11, n.4, 287-291 p.

PFEIFFER, T J. et al. **Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.** 1990. Journal of clinical Microbiology. 1642-1644 p.

POLACHEK, I. et al. **Improved Diagnostic Medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C).** 1980. Laboratory of Clinical Investigation, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland 20205.

RADETSKY, M. **Microtiter broth dilution method for yeast susceptibility testing with validation by clinical outcome.** Journal of Clinical Microbiology .1986.

REFOJO, N. et al. **Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina.** Medical Mycology March 2009. 47, 177184 p.

REOLON, A. et al. **Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da Cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** 2004. v.40, n.5, 293-298 p. 2004.

REX, J. H. et al. **Practice guidelines for the treatment of candidiasis.** Clinical Infectious Diseases, 2000.

SANTOS, LO. et al. **Criptococose no estado do Amazonas: estudo de 75 casos diagnosticados na Fundação de Medicina Tropical/FMT/IMTM Manaus, AM (1988-1998), Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz.** Rio de Janeiro, 2000. 154 p.

SIDRIM, JJC; Rocha, MFG. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** 1a ed. Rio de Janeiro. 2010. Guanabara Koogan. 388p.

SILVA, BK. et al. **Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil.** Rev Iberoam Micol. 2012. v.29, n.1, 40-43 p.

SPEED, B; DUNT, D. **Clinical and Host Differences Between Infections with the Two Varieties of *Cryptococcus neoformans*.** From the Fairfield Hospital for Infectious Diseases, Fairfield, and the NHMRC National Centre for Health Program Evaluation, Department of Public Health and Community Medicine, The University of

TAYLOR, J W. et al. **Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi.** Fungal Genet. Biol. 2000. 31, 21–32 p.

TOTI-RODRIGUES, M. L. **Avaliação de métodos para testes de suscetibilidade in vitro de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida*.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2008. 71 f.

TRILLES, L. et al. ***Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow.** Med Mycol 2003. 36: 119-122 p.

VANBREUSEGHEM, R; TAKASHIO, M. **An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin, 1895, II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov.** Ann. Soc Belg. Med Trop. 1970. v.50, 692–702 p.

VILCINS, I. et al. **Environmental sampling for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from the Blue Mountains National Park, Sydney, Australia.** 2002. Med Mycol 40:53–60 p.

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

ZARAGOZA, O. et al. **The efficacy of complement mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions.** Euro J Immunol. 2003. 33(3):1957-67p.

