

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

ISOLAMENTO DE *Cryptococcus neoformans* (SANFELICE) VUILLEMIN (1901)
DE *Periplaneta americana* (LINNEU, 1758) RECOLHIDAS DE AMBIENTES
PÚBLICOS.

PABLO WALDECK GONÇALVES DE SOUZA

2008



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

**ISOLAMENTO DE *Cryptococcus neoformans* (SANFELICE) VUILLEMIN (1901)
DE *Periplaneta americana* (LINNEU, 1758) RECOLHIDAS DE AMBIENTES
PÚBLICOS.**

PABLO WALDECK GONÇALVES DE SOUZA

***Sob a Orientação do Professor Doutor*
Francisco de Assis Baroni**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária da UFRRJ.

**Seropédica, RJ
2008**

595.728

S729i

T

Souza, Pablo Waldeck Gonçalves de,
1981-

Isolamento de *Cryptococcus*
neoformans (sanfelice) *vuillemin*
(1901) de *periplaneta americana*
(linneu, 1758) recolhidas de
ambientes públicos / Pablo Waldeck
Gonçalves de Souza - 2008.

117f. : il.

Orientador: Francisco de Assis
Baroni.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia
Veterinária.

Bibliografias: 82-108.

1. Barata como transmissora de
doenças - Teses 2. *Cryptococcus*
neoformans - Teses 3. Barata
americana - Teses. I. Baroni,
Francisco de Assis, 1958- . II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia
Veterinária. III. Título.

Bibliotecário: _____ **Data:** ___/___/___

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

PABLO WALDECK GONÇALVES DE SOUZA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária.

Cíntia de Moraes Borba, Dra, FIOCRUZ

Francisco de Assis Baroni, Dr, UFRRJ

Gonzalo Efraim Moya Borja, Dr, UFRRJ

Reinaldo Bolognini Orsi, Dr, Universidade Paulista

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, pois através de sua santa benignidade derrama graças constantes sobre minha vida, me concedendo força para lutar a cada momento, e sabedoria para aprender com meus erros e acertos. Ele, assim, permite ao fim de cada etapa da minha vida, uma Vitória.

Aos meus pais, por permanecerem como esteio em cada passo que decido dar, contribuindo na construção dos alicerces da minha vida, comportando-se sempre como fator incentivador, mesmo nas horas de questionamento. “A vocês meus queridos e amados, Pai e Mãe, quero dar todo meu amor e dedicar cada conquista. Sem vocês, nada seria possível. Esse título não é só meu, é principalmente de vocês”.

A Paula Fernanda, minha namorada, pois participou e compartilhou de cada instante, nesse processo, desde a escolha pela Microbiologia, provas de seleção, e desenvolvimento do projeto.

Ao meu Irmão, por me proporcionar boas conversas e incentivo constante, sem nunca soltar uma palavra de cobrança, mesmo quando essas eram bem vindas.

Ao meu ilustre orientador Francisco de Assis Baroni, primeiro por ter aceitado me orientar. Pela forma impar e, ousado dizer, brilhante com que conduziu o trabalho, e por compartilhar comigo seus saberes. Por cada palavra de incentivo que proferiu à medida em que os isolamentos não ocorriam e a decepção insistia em entrar no meu coração. Professor, nunca vou esquecer suas palavras “Resultado negativo também é resultado”. Tenho o senhor como meu eterno orientador, mas termino essa jornada tendo-o também como amigo, e uma pessoa a qual muito admiro.

Não poderia deixar de agradecer também aos meus amigos e colegas. Em especial ao Felipe Lopes Campos, que no início desse processo teve uma participação muito especial, através de seus conselhos, os quais sempre procurei seguir. Muito obrigado por cada ajuda que me deu e, saiba que através de sua forma sóbria e própria de ser, se tornou uma pessoa cujos passos espero seguir. Ao Felipe Bath, que participou ativamente do último ano de desenvolvimento desse trabalho, fazendo os dias no laboratório, no mínimo, um pouco mais engraçados.

Por fim volto a agradecer a Deus, por colocar na minha vida cada uma das pessoas mencionadas acima.

“Aquele que habita o esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará.

Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele
confiarei.

Porque ele te livrará do laço do passarinho e da peste perniciososa.
Ele te cobrirá com as suas penas, e debaixo das suas asas estarás seguro; a sua
verdade é escudo e broquel.

Não temerás espanto noturno, nem seta que voe de dia,
Nem peste que ande na escuridão, nem mortandade que assale ao meio dia.

Mil cairão ao seu lado, e dez mil a tua direita, mas tu não serás atingido.

Somente com teus olhos olharás e verás a recompensa dos ímpios.

Porque tu, ó Senhor, és o meu refúgio! O Altíssimo é a tua habitação.

Nenhum mal te sucederá, nem praga alguma chegará à tua tenda.

Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em todos os teus caminhos.

Eles te sustentarão na suas mãos, para que não tropeces com teu pé em pedra.

Pisarás o leão e a áspide; calcarás aos pés o filho do leão e a serpente.

Pois que tão encarecidamente me amou, também eu o livrarei; pô-lo-ei num alto retiro, porque conheceu o meu nome.

Ele me invocará, e eu lhe responderei; estarei com ele na angústia; livrá-lo-ei e o glorificarei.

Dar-lhe-ei abundância de dias e lhe mostrarei a minha salvação.

Salmo 91

BIOGRAFIA

Pablo Waldeck Gonçalves de Souza, filho de Antonio Waldeck Gomes de Souza e Leila Maria Alves Gonçalves, natural do Rio de Janeiro – RJ, Brasil, nasceu no dia 09 de dezembro de 1981. Coursou o 1º grau, inicialmente no “Jardim Escola 1.2.3” (Rio de Janeiro-RJ) e posteriormente no “Colégio Belisário dos Santos” (Rio de Janeiro-RJ), permanecendo no mesmo, onde cursou o 2º grau.

Em 2000 deu início à graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, colando grau no dia 04 de junho de 2005.

Ingressou no “Programa de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária” da mesma universidade em que cursou a graduação, no ano de 2006, onde sob a orientação do Professor Doutor Francisco de Assis Baroni, desenvolveu o presente trabalho.

Em 2007, ingressou no curso de especialização em “Promoção da Saúde e Desenvolvimento Social” na Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz – Rio de Janeiro.

SUMARIO

| | |
|---|-----|
| 0. Introdução..... | 14 |
| 1. Revisão de Literatura..... | 17 |
| 1.1 <i>Cryptococcus</i> spp..... | 17 |
| 1.1.1 Histórico..... | 17 |
| 1.1.2 Taxonomia..... | 19 |
| 1.1.3 Ecologia..... | 21 |
| 1.1.4 Epidemiologia..... | 26 |
| 1.1.5 Patogenia..... | 30 |
| 1.1.5.1 Homem..... | 30 |
| 1.1.5.2 Animais..... | 32 |
| 1.1.6 Fatores de Virulência..... | 35 |
| 1.1.7 Sorogrupagem..... | 36 |
| 1.2 <i>Periplaneta americana</i> | 38 |
| 2. Objetivos..... | 41 |
| 3. Material e Métodos..... | 42 |
| 3.1 Locais..... | 42 |
| 3.2 Obtenção das amostras..... | 43 |
| 3.3 Processamento das amostras..... | 46 |
| 3.3.1 Fezes..... | 46 |
| 3.3.2 Baratas..... | 46 |
| 3.4 Isolamento..... | 48 |
| 3.4.1 A partir de fezes..... | 48 |
| 3.4.2 A partir de baratas..... | 49 |
| 3.5 Leitura dos isolamentos..... | 50 |
| 3.6 Identificação das cepas isoladas..... | 52 |
| 3.7 Sorogrupagem..... | 54 |
| 3.8 Fatores de virulência..... | 55 |
| 3.8.1 Produção de fosfolipase..... | 55 |
| 3.8.2 Produção de protease..... | 57 |
| 3.9 Preservação das amostras..... | 58 |
| 4. Resultados e discussão..... | 59 |
| 4.1 Coleta de fezes de pombos..... | 59 |
| 4.2 Coleta de amostras..... | 60 |
| 4.3 Processamento das amostras..... | 65 |
| 4.4 Isolamento e leitura..... | 68 |
| 4.5 Identificação..... | 72 |
| 4.6 Sorogrupagem..... | 73 |
| 4.6.1 Cepas oriundas das fezes..... | 73 |
| 4.6.2 Cepas oriundas de baratas..... | 73 |
| 4.7 Fatores de virulência..... | 74 |
| 4.7.1 Produção de fosfolipase..... | 75 |
| 4.7.1.1 Cepas oriundas das fezes..... | 75 |
| 4.7.1.2 Cepas oriundas de baratas..... | 75 |
| 4.7.2 Produção de Protease..... | 77 |
| 4.7.2.1 Cepas oriundas das fezes..... | 77 |
| 4.7.2.2 Cepas oriundas de baratas..... | 78 |
| 5. Conclusões..... | 81 |
| 6. Referencias Bibliográficas..... | 82 |
| 7. Anexos..... | 109 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Atividade enzimática de protease e fosfolipase padronizadas de acordo com Price et al, 1982..... | 56 |
| Tabela 2: Isolamento de <i>Cryptococcus neoformans</i> oriundos de fezes de pombos, nos locais selecionados para captura dos insetos..... | 59 |
| Tabela 3: Quantidade de baratas capturadas pelos diferentes métodos aplicados..... | 63 |
| Tabela 4: Quantidade de baratas coletadas de acordo com o mês e ano da coleta..... | 64 |
| Tabela 5: Resultado dos testes de produção de fosfolipase, pelas cepas de <i>C. neoformans</i> isoladoas de fezes de pombos..... | 75 |
| Tabela 6: Resultado dos testes de produção de fosfolipase, pelas cepas de <i>C. neoformans</i> isoladoas de baratas..... | 76 |
| Tabela 7: Resultado dos testes de produção de protease, pelas cepas de <i>C. neoformans</i> isoladoas de fezes de pombos..... | 77 |
| Tabela 8: Resultado dos testes de produção de protease, pelas cepas de <i>C. neoformans</i> isoladoas de baratas..... | 78 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Escadaria de acesso ao telhado do Centro Integrado de Educação Pública, localizado em seropédica (CIEP I), que era utilizado como depósito. Um dos locais de onde foi coletado fezes e amostras de insetos..... | 44 |
| Figura 2: Detalhe da torre da igreja com fezes de pombos. Local selecionado para colocação de armadilha..... | 44 |
| Figura 3: Tipos de armadilha, à esquerda a feita com garrafa “pet”, e a outra feita com caixa de papelão..... | 45 |
| Figura 4: Potes em que as baratas capturadas eram acondicionadas para transporte do local de captura até o laboratório, para serem processadas..... | 45 |
| Figura 5: Frasco de Erlenmeyer de 150ml, contendo a barata já triturada e homogeneizada em solução salina. Aguardando o tempo de repouso..... | 48 |
| Figura 6: Fluxograma do processamento dos insetos. | 50 |
| Figura 7: Primo isolamento, em meio com dopamina, de <i>C. neoformans</i> (colônias marrons) obtidas a partir da semeadura direta de uma amostra de barata processada..... | 51 |
| Figura 8: Micromorfologia em lâmina utilizando-se a nigrosina como contraste, evidenciando células de <i>Cryptococcus</i> spp. globosas e capsuladas..... | 53 |
| Figura 9: Da esquerda para direita, temos, crescimento em meio Saboraund, ausência de crescimento em meio contendo ciclohexamida, crescimento celular de coloração marrom em meio com dopamina e produção de uréase em meio de Cristensen..... | 53 |
| Figura 10: Sorogrupagem em meio CGB. Placas Azul cobalto são o controle positivo para o sorogroppo BC..... | 54 |
| Figura 11: Halo de precipitação ao redor da colônia inoculada centralmente na placa de Petri, em meio para produção de fosfolipase..... | 56 |
| Figura 12: Total das amostras coletadas e respectivas porcentagens de cada local de coleta..... | 61 |

RESUMO

SOUZA, Pablo Waldeck Gonçalves de. **ISOLAMENTO DE *Cryptococcus neoformans* (SANFELICE) VUILLEMIN (1901) DE *Periplaneta americana* (LINNEU, 1758) RECOLHIDAS DE AMBIENTES PÚBLICOS**. Seropédica: UFRRJ, 2006. 115p.(Dissertação, Mestrado em Microbiologia Veterinária).

O objetivo deste trabalho foi determinar a presença de *Cryptococcus neoformans* em baratas (*Periplaneta americana*) recolhidas de ambientes públicos. A motivação para esta pesquisa deve-se ao fato desta espécie de barata ser sinantrópica e veiculadora de vários agentes patogênicos para o homem e animais. Os insetos foram recolhidos mortos e também capturados vivos por meio de duas diferentes armadilhas, totalizando 150 amostras. A pesquisa da presença do agente nos insetos foi feita no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais, Depto de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, UFRRJ, por processamento do exoesqueleto e do conteúdo interno dos mesmos, com semeadura em meio de cultivo contendo dopamina. As confirmações de isolamento foram realizadas por meio de testes de macromorfologia, micromorfologia, realização de auxanograma e provas complementares. Não foi obtido isolamento de *Cryptococcus neoformans* de exoesqueleto. Foram obtidos 5 isolamentos (3%) a partir do conteúdo interno dos insetos que, após sorogrupagem em meio CGB revelaram-se como pertencentes ao sorogrupo AD. Testes evidenciaram que 80% das cepas são forte produtoras de fosfolipase e 100% forte produtoras de protease. Consideramos que as baratas da espécie *Periplaneta americana* são um potencial vetor para a levedura estudada.

Palavras chave: *Cryptococcus neoformans*, baratas, ambientes públicos.

ABSTRACT

SOUZA, Pablo Waldeck Gonçalves de. **ISOLATION OF *Cryptococcus neoformans* (SANFELICE) VUILLEMIN (1901) OF *Periplaneta americana* (LINNEU, 1758) COLLECTED IN PUBLIC PLACES.** Seropédica: UFRRJ, 2006. 115p.(Dissertação, Mestrado em Microbiologia Veterinária).

The objective of this paper was determined the presence of *Cryptococcus neoformans* in cockroach (*Periplaneta americana*) collected in public places. The motivation for this research was based on the fact that this species of cockroach is synanthropic and vehicle of several pathogenic agents for man and animals. The insect were collected already dead and also collected alive using different traps, at all, were 150 samples. The research of the presence of the agents in the insects was made in Laboratory of Pathogenic and Environmental Yeasts, Department of Microbiology and Immunology Veterinary, Institute of Veterinary, UFRRJ, by the process of the exoskeleton and the internal content of then, sowing in cultivation medium containing dopamine. The confirmations of isolation were made by macromorfology and micromorfology test, realization of auxanographic method and complementally proofs. Was not obtained isolation of *Cryptococcus neoformans* of exoskeleton. Were obtained 5 isolated (3%), starting by the content of the insects that, after the serogrouping in CGB medium, show them self as belonging to AD serum group. Test show that 80% of the stumps are big producing of phospholipase and 100% big producing of protease. We considerate that the cockroaches of the species *Periplaneta americana* are, potentially, a vector for the studied yeast.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, cockroaches, public places.

INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose sistêmica exógena (Esteves et al., 1977), oportunista, causada pela levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans*, a qual possui tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), respiratório e tegumentar. O comprometimento da resposta imune é o principal fator predisponente para a ocorrência da doença, sendo os pacientes com doenças imunodepressoras, como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), neoplasias linfoproliferativas ou sarcomas, sob tratamento imunossupressor ou transplantados, mais suscetíveis à doença (Kwon-Chung e Bennett, 1992; Mitchell e Perfect, 1995; Casadevall e Perfect, 1998; Darzé et al., 2000; Pappalardo e Melhem, 2003; Baroni et al., 2006).

Tradicionalmente, tem sido referidas 2 variedades e 5 sorotipos de *Cryptococcus neoformans*. A variedade *neoformans* apresentando os sorotipos A, D e AD, e a variedade *gattii*, com os sorotipos B e C (Fernandes et al., 2000).

Franzot et al., (1999) propuzeram a reclassificação do sorotipo A, em uma nova variedade denominada *grubii*. As variedades apresentam diferenças fenotípicas, genotípicas, bioquímicas, epidemiológicas e clínicas (Casali et al., 2001; Sorrel, 2001).

Recentemente, com base em dados de subtipagem, seqüenciamento de nucleotídeos e análise filogenética, foi sugerida a reclassificação de *C. neoformans* var. *gattii* como uma nova espécie, *C. gattii* (Boekhout et al., 2001; Kwon-Chung et al., 2002).

C. neoformans variedade *neoformans* pode ser encontrado em várias fontes ambientais. Entretanto, relaciona-se essa espécie, na maioria das vezes, com excretas acumuladas de aves, principalmente pombos domésticos (Granados e Castañeda, 2005; Kobayashi et al., 2005). Já a variedade *gattii* está relacionada a espécies de *Eucalyptus*,

como *Eucalyptus camaldulensis* (Ellis e Pfeiffer, 1990) e ôcos de várias espécies de árvores em biodegradação (Lazéra et al., 1998, 2000; Granados e Castañeda, 2005).

Devido à alta concentração de *C. neoformans* nas excretas de aves, a alta prevalência de aves em áreas urbanas, a recuperação de *C. neoformans* do ar em locais com acúmulo de excretas de aves e a severidade da criptococose em seres humanos, existe um crescente interesse na relação entre as aves, suas excretas e a criptococose humana (Casadevall e Perfect, 1998; Casali et al., 2001).

Appel e Rust (1985) mencionaram que 12 espécies de blatódeos, dentre essas, *Periplaneta americana*, causam sérios problemas à saúde pública, devido ao comportamento sinantrópico, habitando o domicílio e o peridomicílio.

Em 1984, Swinne e Eyckmans isolaram pela primeira vez *C. neoformans* do conteúdo intestinal de baratas (*Periplaneta americana*), em Kinshasa, Zaire, feito novamente relatado por Swinne et al, em 1986.

As baratas são onívoras e se alimentam de uma grande variedade de materiais, preferencialmente que contenham amido e açúcares. Ingerem leite, queijo, carnes, grãos, açúcar, chocolate, doce, entre muitos outros produtos. Desse modo, nenhum material comestível que o homem possa ingerir está isento da probabilidade de contaminação por estes insetos, que também se alimentam, de sangue fresco ou seco, excrementos, unhas das mãos e pés, de outras baratas mortas ou feridas, cadáveres, detritos alimentares que ficam na boca e materiais diversos como papéis, livros etc (Ponce et al., 2005).

Desde que *Cryptococcus* spp. foi isolado pela primeira vez, muitos trabalhos foram realizados. Porém há muitos aspectos clínico-epidemiológicos e ecológicos desconhecidos, especialmente no Brasil. Quanto à epidemiologia do agente, sabe-se que ocorre grande

heterogeneidade de distribuição dos sorotipos e variedades em diferentes países ou regiões de um mesmo país (Nishikawa et al., 2003).

No estudo da criptococose, é importante o conhecimento e a vigilância extensiva dos reservatórios e fontes de infecção (Nigro et al., 1987), fornecendo, assim, dados epidemiológicos para a implantação de programas de prevenção e terapias efetivas (Horta et al., 2002).

Tendo em vista as características epidemiológicas já conhecidas sobre o *C. neoformans*, além do fato da literatura relatar o isolamento desse agente a partir destes insetos, o presente trabalho visou fazer inicialmente o isolamento dessa levedura, tanto do exoesqueleto quanto do conteúdo interno de baratas (*Periplaneta americana*), além de verificar a capacidade de produção de protease e fosfolipase, “in vitro”, das cepas isoladas e realizar a sorogrupagem bioquímica das mesmas.

1- REVISÃO DE LITERATURA

1.1- *Cryptococcus* spp.

1.1.1- HISTÓRICO

Busse, em 1894, realizou a primeira descrição da criptococose, através da identificação de um corpúsculo redondo-ovalado, causador de lesão semelhante a um sarcoma, na tíbia de uma paciente. Analisando, no mesmo ano, o caso, Buschke concluiu que o agente causador da doença era um coccídio (Mitchell e Perfect., 1995).

Ainda em 1894, Francesco Sanfelice isolou um microorganismo encapsulado a partir do suco de pêssigo, denominando-o em 1895 de *Saccharomyces neoformans* (Drouhet.,1997). Posteriormente, os termos *C. hominis* e *C. neoformans* foram designados para acomodar os isolados de Busse e Sanfelice, respectivamente, pois esses microorganismos não eram capazes de fazer a fermentação de carboidratos, e formar ascósporos, que são características marcantes do *Saccharomyces* spp. (Mitchell e Perfect., 1995).

Em 1895, Sanfelice também realizou o primeiro isolamento de *Cryptococcus* spp. em animais, a partir dos linfonodos de um boi. Em 1901, Vuillemin e Klein isolaram o agente de uma lesão pulmonar de porco e do leite. Já o primeiro caso descrito em eqüinos deu-se no ano seguinte, com a observação da levedura em uma massa pulmonar mixomatosa (Jungerman e Schwartzman, 1972).

Após a observação da levedura na meninge humana, descreveu-se a doença como uma tuberculose, pelos achados do agente em cistos gelatinosos. Com o reconhecimento de

mais dois casos dessa meningite, o agente etiológico foi chamado em 1916, por Scotdard e Cutler, de *Torula histolytica*, pois observaram que os tecidos parasitados eram rodeados por áreas claras, confundindo a cápsula com áreas de lise celular (Casadevall e Perfect, 1998).

No Brasil, o professor Carlos da Silva Lacaz e Floriano de Almeida realizaram, respectivamente, os primeiros relatos de criptococose, nos anos de 1941 e 1944 (Pappalardo e Melhem, 2003).

Swinne-Desgain (1975) relata que Emmons em 1954 realizou o primeiro isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos.

Kwon-Chung e Bennett (1992) afirmam que os anos 50 foram importantes para o estabelecimento do nome da doença como criptococose e a renomeação da levedura, que passou a ser chamada *C. neoformans*, reduzindo a confusão causada pelas terminologias anteriores. Nesta década, também se evidenciou o nicho de *C. neoformans* no solo, ninhos e excretas de pombos.

A partir dos anos 80, com o surgimento da epidemia da AIDS e da utilização de fármacos imunossupressores, houve um aumento da incidência da criptococose, sendo essa, atualmente, a infecção fúngica de maior prevalência mundial (Franzot et al., 1997; Calvo et al., 2001; Pappalardo e Melhem, 2003).

1.1.2- TAXONOMIA

A levedura encontra-se hoje classificada de acordo com o estado teleomorfo (Casadevall e Perfect., 1998; Kurtzman e Fell., 1998):

Reino: Fungi

Divisão: Basidiomycota

Ordem: Filobasidiales

Família: Filobasidiaceae

Gênero: *Filobasidiella*

Espécie:

Filobasidiella neoformans var *neoformans* (sorotipos A e D)

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

Tendo como correspondentes anamorfos respectivamente:

Cryptococcus neoformans var *neoformans*

Cryptococcus neoformans var *gattii*

Franzot et al., (1999) baseando-se em antígenos específicos da cápsula de mucopolissacarídeo, dividiram *C. neoformans* em três variedades e cinco sorotipos, sendo o sorotipo “A” pertencente à variedade *grubii*, o sorotipo “D” à variedade *neoformans*, e “B” e “C” à variedade *gattii*. Sob essa classificação, a designação correta para o sorotipo “AD” ainda não foi definida (Lengeler et al., 2001), mas alguns autores o consideram híbrido (Boekhout et al., 2001), enquanto outros como Grover et al., (2007) tem considerado esse

sorotipo pertencente à variedade *neoformans*. As variedades apresentam entre si diferenças fenotípicas, genotípicas, bioquímicas, epidemiológicas e clínicas (Casali et al., 2001; Sorrel., 2001).

Kwon-Chung et al., (2002), com base em dados de subtipagem, seqüenciamento de nucleotídeos e análise filogenética, sugeriram a reclassificação de *C. neoformans* var. *gattii* como uma nova espécie, *C. gattii*. Hoje, essas duas novas classificações são mais aceitas.

No estado anamorfo, as duas variedades são semelhantes, mas, no estado teleomorfo diferem fenotipicamente na forma de seus basidiósporos. Os basidiósporos da variedade *neoformans* são esféricos, oblongos, elípticos ou, ainda, cilíndricos e com paredes rugosas. Os da variedade *gattii* são baciliformes e apresentam a parede com aspecto liso (Ellis e Howard., 1992).

Apesar dos avanços obtidos após anos de pesquisa, ainda hoje não existe uma concordância taxonômica entre os autores e, após a consagração da utilização das técnicas moleculares, muitas proposições de nomenclatura vêm surgindo e se modificando ao longo dos anos (Kwon-Chung et al., 2002).

Recentemente, Hibbett et al., (2007), sugerem a reclassificação da levedura como sendo pertencentes ao Reino Fungi, Sub-Reino Dikarya, Filo Basidiomycota, Sub-Filo Agaricomycotina, Classe Tremellomycetes e a partir de então à Ordem Filobasidiales como referem outros autores.

Registram-se na literatura pelo menos trinta e sete sinônimos, para esse agente, dos quais os mais conhecidos são: *Saccharomyces neoformans*, Sanfelice 1895, *Cryptococcus hominis*, Vuillemin 1901, *Torula histolytica*, Stoddard e Cutler 1916, *Torulopsis neoformans*, Redaelli 1931, *Debaryomyces hominis*, Todd e Hermann 1936 (Esteves et al., 1977; Kurtzman e Fell., 1998).

1.1.3- ECOLOGIA

C. neoformans possui vida saprófita, sendo Emmons, em 1951, quem isolou pela primeira vez o agente do solo (Silva e Paula., 1963). Posteriormente verificou-se haver uma estreita relação entre isolamento do solo e ninhos de pombos (Machado et al., 1993).

C. neoformans e suas variedades podem ser encontrados em uma grande diversidade de locais, como frutas, suco de fruta fermentado, leite, excretas de aves, vegetais em decomposição e ôcos de várias espécies de árvores, solo, além da cavidade nasal e pele de cães e gatos (Lazéra et al., 1993, 1996, 2000; Casadevall e Perfect, 1998; Connolly et al., 1999; Pappalardo e Melhem, 2003).

As variedades *grubii* (proposta por Franzot et al., 1999) e *neoformans*, são encontradas em várias fontes ambientais, estando relacionadas, na maioria das vezes, com excretas acumuladas de aves, principalmente pombos domésticos (Sorrel e Ellis., 1997; Granados e Castaneda., 2005). As primeiras evidências da relação de *C. neoformans* com excretas de pombos foram demonstradas por Emmons 1955 apud Silva e Paula (1963) e, a partir de então, são muitos os estudos levando-se em consideração o isolamento ambiental desta levedura. A partir dessa fonte saprobiótica, foram realizados isolamentos em várias partes do mundo, inclusive no Brasil, (Silva e Paula., 1963; Machado et al., 1993; Passoni et al., 1998; Montenegro e Paula., 2000; Horta et al., 2002; Casali et al., 2003; Soares et al., 2005).

Assim como ocorre em isolados clínicos, o sorotipo “A” é isolado com maior frequência em amostras ambientais no mundo inteiro (Passoni et al., 1998; Montenegro e Paula., 2000; Filiu et al., 2002; Horta et al., 2002; Casali et al., 2003; Granados e Castaneda., 2005; Soares et al., 2005; Pereira., 2006).

Nos centros urbanos existe alta contaminação por *C. neoformans*, relacionada principalmente ao acúmulo de excretas de pombos, permitindo que muitas pessoas estejam expostas aos propágulos infectantes do fungo (Montenegro e Paula., 2000). Hubalek (1975) estudou a sua distribuição em torres de igreja. No Brasil, Baroni et al., (2006) isolaram essa levedura também de fezes de pombos localizadas em torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro e Baroni et al., (2004) realizaram o mesmo isolamento em torres de igrejas da cidade de Manaus.

A alta frequência de isolamento de *C. neoformans* em excretas de aves está ligada à presença de um ambiente favorável ao crescimento do fungo (Staib., 1962), pela sua adaptação bioquímica, que lhe confere a habilidade de assimilação de creatinina, ácido úrico e purinas como fontes de nitrogênio, compostos esses, em abundância nesse nicho ecológico (Esteves et al., 1977). Apesar de também ser capaz de assimilar a creatinina, a variedade *gattii*, geralmente, não está associada às excretas de aves, devido, possivelmente, à regulação diferenciada de enzimas responsáveis por esse metabolismo (Casali et al., 2001).

Os pombos, provavelmente por sua temperatura corporal ser aproximadamente de 42°C, não desenvolvem a criptococose, pois essa temperatura inibiria a multiplicação da levedura (Sorrel e Ellis, 1997). A alta concentração de amônia nas fezes frescas também pode inibir o crescimento do agente.

As partículas infecciosas presentes em excretas de pombos, com tamanho compatível com a deposição alveolar, a recuperação de *C. neoformans* do ar de locais contaminados com excretas de aves, a virulência das linhagens isoladas e a alta prevalência de anticorpos em inquéritos sorológicos e testes intradérmicos em criadores de pombos sugerem que esta seja uma importante fonte de infecção (Casali et al., 2001).

Além dos pombos, outras aves podem contribuir para a propagação do fungo por meio de excretas (Abegg et al., 2006; Pereira 2006).

Cryptococcus neoformans foi isolado também a partir de excretas de outras espécies de aves como canário-belga, canário-do-reino, canário-da-terra-verdadeiro, periquito-australiano, calopsita, agapornis, mandarim, pombo-rabo-de-leque, pombo-africano e papagaio (Filiú et al 2002), papagaio-moleiro, papa-cacau, chauá, periquito-rei, jandaia, periquito-maracanã, periquito-australiano, calopsita, maitaca-de-maximiliano e periquito-alexandrino (Abegg et al., 2006), pombo, rolinha diamante, agapornis, calopsita, periquito australiano, mandarim, diamante de gould, canário-belga, manon, calafate e star finch (Pereira, 2006).

Apesar do isolamento de *C. neoformans* ser abundante em excretas, o fungo dificilmente é isolado do aparelho digestório de aves (Casadevall e Perfect, 1998). O mecanismo pelo qual as excretas tornam-se infectadas ainda é incerto (Sorrel e Ellis, 1997; Filiú et al., 2002), entretanto sugere-se que o desenvolvimento de *C. neoformans* em excretas de aves se deva à grande quantidade de células fúngicas no ambiente, as quais encontram compostos ricos em nitrogênio nas excretas, o que facilita a sua multiplicação (Casadevall e Perfect, 1998).

Swinne-Desgain (1975), isolou *C. neoformans* de água de bebedouros de pombos, de gaiolas de onde as excretas eram positivas ou negativas e de amostras do ar. Um ano depois, o mesmo autor, buscando esclarecer melhor esta origem, demonstrou que muitos pombos carregam o agente no inglúvio, mas não no baixo trato intestinal. Para testar a viabilidade da levedura no trato gastrintestinal, forneceu células de *Cryptococcus neoformans* a pombos, que permaneceram viáveis no inglúvio por até 86 dias (Swinne-Desgain, 1976).

Costa et al., (2007) relatam terem feito isolamento *C. neoformans* de insetos vulgarmente conhecidos como tatuzinhos (*Armadillidium vulgare*), coletados em peridomicílio na região metropolitana de Belém.

Swinne e Eyckmans (1984), isolaram pela primeira vez *C. neoformans* do conteúdo digestivo de baratas (*Periplaneta americana*), no Zaire. Swinne et al., (1986) relataram novamente o isolamento da levedura do conteúdo digestivo das baratas, quando do processamento de 113 insetos. O conteúdo digestivo foi removido assepticamente por dissecação do inseto, sendo diretamente inoculado em meio seletivo e incubado a 25°C, sendo a leitura feita depois de 8 dias. Foi obtido isolamento do conteúdo digestivo de 2/118 baratas.

Estudos sugerem que ôcos de árvores constituem um nicho natural para todas as variedades (Grover et al., 2007). No Brasil, todas as variedades de *C. neoformans* já foram isoladas de várias espécies de árvores nativas ou exóticas, em ambientes urbano, florestal e rural, demonstrando que não há relação entre uma árvore específica e o fungo (Lazéra et al., 1993, 1996, 2000).

De acordo com Sorrel e Ellis (1997) a variedade *gattii* tem uma distribuição geográfica mais restrita do que a variedade *neoformans* ou *grubii*. O primeiro isolamento da variedade *gattii* foi realizado em 1990, por Ellis e Pfeiffer, na Austrália, em associação com eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) (Grover et al., 2007). Posteriormente, outras espécies de eucaliptos como *E. tereticornis*, *E. rudis* e *E. gomphocephala* também foram relatados como nichos ecológicos. No Brasil, Lazéra et al., (1998) encontraram altas concentrações dessa variedade em ôcos de árvores em biodegradação, protegidos dos efeitos letais dos raios solares. Apesar de Ellis e Pfeiffer (1990) proporem que a formação de basidiósporos e a dispersão dos propágulos infecciosos ocorrem intensamente durante a estação de floração

do eucalipto, Granados e Castaneda (2005), na Colômbia, não encontraram associação entre a floração das árvores e a presença do fungo. Essa variedade também já foi isolada a partir de excretas de aves (Abegg et al., 2006).

A variedade *gattii* de *C. neoformans* é a mais isolada em ambientes envolvendo vegetações. No entanto existem relatos de isolamentos do sorotipo “A”, como foi demonstrado por Ergin et al., (2004), isolando este de *Eucalyptus camaldulensis* na Turquia. Já no Brasil, Kobayashi et al., (2005), também isolaram este sorotipo de *Eucalyptus* spp. em Goiás.

Os fatores específicos de cada região, como temperatura, umidade e exposição à luz, influenciam a obtenção de resultados positivos (Franzot et al., 1997; Casadevall e Perfect, 1998; Montenegro e Paula, 2000; Granados e Castaneda, 2005). Da mesma forma, o microclima (temperatura e umidade do substrato), fatores abióticos e bióticos também influenciam no crescimento (Granados e Castaneda, 2005).

Alguns autores afirmam que células de *C. neoformans* no solo ou em plantas em decomposição, expostas ao tempo, são eliminadas pela luz solar (Ellis e Pfeiffer, 1990). Outros fatores ambientais podem interferir na ecologia de *C. neoformans*, como foi observado por Neilson et al., (1978), que estudaram o trato gastrointestinal de camundongos como modelo de porta de entrada para *C. neoformans*. Observaram, neste estudo, amebas de vida livre (*Acanthamoeba polyphaga*) fagocitando células de *C. neoformans*.

Além da ação de protozoários, bactérias também já foram relatadas inibindo *Cryptococcus neoformans*. Ruiz et al., (1982), verificaram várias bactérias com atividade anticriptocócica, isoladas de fezes de pombos.

Uma outra característica, relacionada à ecologia dessa levedura, é a influência da produção de micocinas ou toxinas “killer”. Produzidas por alguns fungos, podem controlar o crescimento de outros, fenômeno dependente da temperatura, do pH, e do substrato (Morace et al, 1984). Estas micocinas podem ser produzidas por leveduras ocorrentes em substratos específicos como o solo, frutas, vegetais em decomposição, processos fermentativos, (Criseo et al., 1995).

1.1.4- EPIDEMIOLOGIA

Geralmente a criptococose está relacionada à infecção por *C. neoformans* variedades *grubii*, *neoformans*, e *gattii*, sendo dificilmente causada por outras espécies como, por exemplo, *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. curvatus*, *C. uniguttulatus* (Mitchell e Perfect, 1995; Casadevall e Perfect, 1998). O estudo sobre a doença e seu agente passou a ser mais intenso a partir dos anos 80 por causa da epidemia de AIDS, já que o agente em questão é oportunista (Pappalardo e Melhem, 2003).

Em todo mundo, o sorotipo A é mais comumente isolado, seguido respectivamente pelos sorotipos B e AD (Kwon-Chung et al., 1982; Kwon-Chung e Bennett, 1984; Mitchell e Perfect, 1995; Franzot et al., 1997; Casadevall e Perfect, 1998; Litvintseva et al., 2005). Os sorotipos D e C são menos relatados, exceto em alguns países do continente europeu, algumas áreas dos Estados Unidos e Ásia (Kwon-Chung e Bennett, 1984; Dromer et al, 1996; Litvintseva et al, 2005)

Lacaz e Rodrigues (1983) realizaram, no Brasil, um estudo de identificação dos sorotipos de 25 amostras clínicas e observaram que 56% delas pertenciam ao sorotipo A, seguidas pelos sorotipos B e D respectivamente.

Soares et al (2005), analisaram 79 amostras de fezes de pombos, em Santos-SP, encontrando em 13,9% *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A), 12,6% de *Cryptococcus albidus* e 8,9% de *Cryptococcus laurentii*. Treze destas amostras eram provenientes de instituições de saúde. Rustan et al., (1992) já haviam isolado *Cryptococcus neoformans* de amostras colhidas na periferia de um hospital na cidade de Córdoba.

A predominância do sorotipo A em isolados clínicos, seguido pelo sorotipo B foi demonstrada novamente por diversos autores (Rozenbaum et al., 1992; Rozenbaum e Gonçalves, 1994; Aoki et al., 1999; Calvo et al., 2001; Horta et al., 2002; Ohkusu et al., 2002; Fernandes et al., 2003; Nishikawa et al., 2003; Igreja et al., 2004; Oliveira et al., 2004; Delgado et al., 2005). O sorotipo AD, entretanto, apresentou maior prevalência que o sorotipo D (Nishikawa et al., 2003).

Nishikawa et al., (2003) relatam que o sorotipo A é prevalente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, tanto em isolados clínicos quanto ambientais, enquanto nas regiões Norte e Nordeste o sorotipo B predomina em todos os isolados. De acordo com Pappalardo e Melhem (2003) a variedade *gattii* parece ser endêmica na região nordeste do nosso país, representando 71% dos casos.

As variedades *grubii* e *neoformans* possuem distribuição cosmopolita e são consideradas oportunistas, contaminando predominantemente indivíduos imunocomprometidos (Rozenbaum e Gonçalves, 1994; Mitchell e Perfect, 1995; Speed e Dunt, 1995; Franzot et al., 1997; Casadevall e Perfect, 1998; Sorrel, 2001; Grover et al., 2007). A variedade *gattii*, entretanto, é mais restrita quanto a sua distribuição, estando

usualmente associada a áreas tropicais e subtropicais (Ellis e Pfeiffer, 1990; Mitchell e Perfect, 1995; Casadevall e Perfect, 1998; Sorrel, 2001; Grover et al, 2007). A variedade *gattii* é predominantemente patogênica, e conhecida como o agente primário da criptococose sistêmica, isolada, ao contrário das variedades anteriores, principalmente em pacientes imunocompetentes (Rozenbaum et al., 1992; Rozenbaum e Gonçalves, 1994; Corrêa et al., 1999; Fraser et al., 2003). Sua prevalência no Brasil é considerada uma das mais altas na América do Sul (Montenegro e Paula, 2000).

Mitchel e Perfect (1995) relatam que a criptococose na Europa, Estados Unidos, Austrália e América do Sul, ocorre em 6 a 10% dos pacientes com AIDS enquanto que 15 a 35% desse mesmo tipo de paciente são positivos no Continente Africano. No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, no período entre 1980 e 2002, 6% das infecções oportunistas associadas à AIDS foram causadas por *C. neoformans* (Ministério da Saúde do Brasil, 2002). A criptococose é a doença oportunista mais observada nos pacientes com AIDS (Mitchell e Perfect, 1995; Pappalardo e Melhem, 2003). Segundo Passoni et al (1999) os pacientes portadores de HIV, na cidade do Rio de Janeiro, expostos à variedade *neoformans* no ambiente doméstico, apresentam risco de criptococose duas vezes maior que os pacientes portadores de HIV não expostos ao fungo em seus domicílios.

Pappas e Perfect (1999) sugerem que dentre os principais fatores predisponentes à criptococose, nos HIV negativos, encontra-se a corticoterapia, transplante de órgãos, falência de órgão, diabetes mellitus, doenças reumatológicas, doenças pulmonares crônicas, doenças hematológicas ou outras patologias de caráter maligno.

Apesar de a doença ser, geralmente, decorrente de uma única cepa de *Cryptococcus* spp. (Brandt et al., 1996; Franzot et al., 1997; Meyer et al., 1999; Litvintseva et al., 2005), a infecção por mais de uma variedade do fungo no mesmo paciente foi relatada por Meyer et

al., (1999), Igreja et al., (2004) e Litvintseva et al., (2005). Neste caso, haveria exposição a mais de uma variedade aliada à debilidade causada pelo próprio agente da doença, que secreta compostos bioquímicos, como por exemplo, a cápsula mucopolissacarídica.

De acordo com Passoni et al (1998) e Casadevall e Perfect (1998), a via de infecção é pela inalação de leveduras dessecadas ou por basidiósporos. Ganendren et al., (2006) realizaram estudos sobre atividade de enzimas extracelulares, relacionando amostras ambientais como causadoras de criptococose pulmonar, sugerindo que a via inalatória é possível.

Castro et al (2006) relatam um caso de provável transmissão vertical de *C. neoformans* de uma mãe HIV positiva, para seu filho, por via hematogênica no período periparto.

A doença, no que diz respeito à predisposição etária e sexual, é relatada ser mais comum em homens adultos (Rozenbaum e Gonçalves, 1994; Mitchell e Perfect, 1995; Lopes et al., 1997; Darzé et al., 2000; Fernandes et al., 2000, 2003; Meyer et al., 2003; Pappalardo e Melhem, 2003; Litvintseva et al., 2005).

Fernandes et al (2000), Mitchell e Perfect (1995) relatam, que a incidência da doença em crianças é baixa, sendo ainda assim associada ao HIV e outros desarranjos imunológicos (Leggiadro et al, 1991). Corrêa et al (1999) e Pappalardo e Melhem (2003) observaram um aumento nos relatos da criptococose nessa faixa etária ocorridos no Brasil. Esse aumento está ligado à migração da população da área urbana para a área rural, desnutrição ou ao aumento do número de crianças imunocomprometidas (Corrêa et al 1999).

Rozenbaum e Gonçalves (1994) defendem que a exposição ao agente normalmente ocorre quando os indivíduos ainda são jovens, havendo reativação da infecção latente na idade adulta.

A ocorrência da doença em pacientes com AIDS, sendo ela, resultante da reativação da infecção ou, produzida por novas linhagens, é um problema crescente (Casali et al., 2001; Igreja et al., 2004). Segundo Rozenbaum e Gonçalves (1994), 15 a 25% dos pacientes sem AIDS e aproximadamente 50% dos pacientes soropositivos para o vírus HIV podem apresentar recorrência da doença.

Geralmente, a criptococose está associada à alta mortalidade (Trilles et al., 2004). De acordo com Mitchell e Perfect (1995), a mortalidade durante a terapia inicial é de 10 a 25%, e em 12 meses, é de 30 a 60%. No Brasil, a mortalidade em pacientes com criptococose, com ou sem doença predisponente, fica em torno de 40 a 66% (Calvo et al., 1991; Lopes et al., 1997; Corrêa et al., 1999; Darzé et al., 2000; Pappalardo e Melhem, 2003).

1.1.5- PATOGENIA

1.1.5.1- HOMEM

Admite-se que a infecção se faz por via inalatória, chegando o agente ao pulmão onde se origina a doença primária localizada que, em regra, é transitória e pode passar despercebida. A partir do foco e por disseminação hematogena, produzem-se lesões na

pele, nos ossos e nas vísceras. O sistema nervoso central é freqüentemente afetado (Esteves et al, 1977).

Segundo Pappalardo e Melhem (2003), a criptococose pode se apresentar de forma localizada ou generalizada. O fungo coloniza primariamente os pulmões, podendo causar doença aguda, subaguda ou crônica e, em seguida pode invadir o sistema nervoso central (SNC), vindo acarretar quadros de meningite, encefalite ou meningoencefalite (Casadevall e Perfect, 1998; Casali et al., 2001). Outros tecidos também são acometidos, especialmente em indivíduos HIV positivos ou sob terapia imunossupressora prolongada (Mitchell e Perfect, 1995; Lacaz et al, 2002). A maioria dos casos de infecção cutânea, são oriundos da criptococose disseminada (Lacaz et al, 1991; Casadevall e Perfect, 1998; Lacaz et al, 2002). Dora et al, (2006) afirmam que a doença causada pela variedade *gattii* em pacientes imunocompetentes é uma manifestação rara da doença, e pode ser uma das primeiras manifestações da criptococose disseminada.

Como já foi dito anteriormente, a penetração do agente ocorre pela via respiratória (Buchanan e Murphy, 1998). Calvo et al (1991) e Mitchell e Perfect (1995) relatam que apesar do pulmão ser a porta de entrada do patógeno no organismo, a infecção, neste caso, raramente manifesta sinais clínicos, sendo a meningoencefalite a forma clínica mais comum da doença em humanos. De acordo com Abegg (2003) a levedura pode permanecer latente no hospedeiro e ser reativada por um evento imunocomprometedor.

A levedura apresenta tropismo pelo sistema nervoso central (SNC) (Silva et al., 2006). Esse tropismo além de representar uma fuga ao sistema imune do hospedeiro, pode ser explicado pela grande quantidade de catecolaminas existente no SNC, que serve de substrato para a enzima fenoloxidase. A melanina, produzida por células de *C. neoformans* protege o agente da atividade oxidante do SNC (Mitchell e Perfect, 1995).

A maioria dos pacientes com AIDS e neurocriptococose possui sinais e sintomas de meningite ou meningoencefalite subaguda, como cefaléia, náusea, vômito, febre, rigidez de nuca, letargia, alterações no estado mental, distúrbio na personalidade, perda de memória, lesões de nervos cranianos, déficits visuais e outros. Grandes criptococomas pulmonares e cerebrais são comumente associados à variedade *gattii* (Calvo et al., 1991; Mitchell e Perfect, 1995; Darzé et al., 2000; Fernandes et al., 2000; Casali et al., 2003; Pappalardo e Melhem, 2003).

A criptococose pode estar associada a outras infecções fúngicas, principalmente candidíase, dermatofitose, pitiríase versicolor, pneumocistose, paracoccidioidomicose ou histoplasmose, além de outras doenças oportunistas, como a tuberculose (Fernandes et al., 2000; Casali et al., 2003).

1.1.5.2- ANIMAIS

Nos animais, de um modo geral, as infecções por fungos no sistema nervoso são incomuns, incluindo-se a criptococose (Lavelly e Lipsitz, 2005). Em animais de companhia, no entanto, a prevalência da criptococose parece ser igual ou até mesmo maior quando comparada à de seres humanos (Malik et al., 1997).

Dentre os animais, a espécie felina é a mais acometida (Malik et al., 1997; Kerl, 2003) sendo que, nesses animais, a criptococose é a micose sistêmica mais comum em países de clima temperado (Kerl, 2003) e no Brasil, a segunda mais comum perdendo somente para esporotricose (Larsson, 2000). Na infecção respiratória, há a formação de

uma massa poliposa, que se exterioriza pelas narinas, conhecida como “nariz de palhaço” (Scott et al, 1995).

Segundo Malik et al., (1995), a rinosinusite é a infecção primária na maioria dos cães e gatos, envolvendo a porção caudal da cavidade nasal e seios nasais, atingindo o SNC através da placa cribiforme ou por via hematógena. Os sinais envolvem o aparelho respiratório superior (cavidade e plano nasal, ossos turbinados nasais, seios frontais, ossos e tecido subcutâneo, além do aparelho nasolacrimal e linfonodos), SNC e/ou bulbo ocular (Malik et al., 1995) e incluem deformidade nasal e facial, tumores protuberantes, corrimento nasal, espirro, estridores nasais e mudanças na fonação. A cegueira pode ser causada por descolamento de retina e corioretinite granulomatosa. A meningoencefalite é caracterizada por depressão, paresia, papiledema, convulsão, ataxia, andar em círculo, cefaléia, dor tóraco-lombar e cervical, distúrbios vestibulares e envolvimento múltiplo dos nervos cranianos.

O aparelho respiratório inferior é raramente afetado e as lesões cutâneas podem aparecer. Podem ocorrer, além disso, sinais inespecíficos como perda de peso, febre, letargia e anorexia, como resultado de doença crônica (Malik et al., 1995; Flatland et al., 1996; Kerl, 2003).

Não foram evidenciados fatores predisponentes para criptococose em animais. Entretanto, a leucemia viral felina e a imunodeficiência adquirida felina parecem ser desfavoráveis ao tratamento de criptococose em gatos (Kerl, 2003).

Beheregaray et al., (2005), isolaram *Cryptococcus neoformans* em um cão apresentando comprometimento de linfonodos, pele, olhos e glândulas mandibulares.

Um caso de criptococose cerebral em bovino foi diagnosticado na Paraíba (Macedo et al., 2005). Costa et al. (1993) isolaram o agente de rebanhos leiteiros com mastite clínica

e subclínica. Na espécie bovina, a mastite criptocócica é a forma mais comum da doença e os sinais clínicos são extremamente variáveis, incluindo edema moderado e transitório em um ou mais quartos de teto até edema severo e distensão da glândula afetada. Os linfonodos supra-mamários também são afetados. Os animais com infecção moderada não demonstram outros sinais, ao contrário das vacas com infecção severa que mostram-se com grande desconforto e são relutantes aos movimentos. Pode haver febre, depressão, anorexia, desidratação, além de diminuição ou até ausência da produção láctea (Jungerman e Schwartzman, 1972).

Os cavalos são mais acometidos por granulomas nasais, massas mixomatosas no pulmão e infecção labial (Jungerman e Schwartzman, 1972). A criptococose em eqüinos promove sinais respiratórios e exsudato nasal como resultado de granulomas nasais, que ocorrem também nos pulmões, nas vísceras e subcutâneo (Roberts et al, 1981 ; Chandna et al, 1993). Já foram observados também outros sintomas como aborto (Blanchard e Filkins, 1992) e granuloma abdominal associado à pneumonia criptocócica (Riley et al, 1992).

A criptococose aviária é rara, mas já foi relatada em estudos na Austrália afetando tanto aves imunodeprimidas como imunocompetentes, levando a quadros de infecção subcutânea e/ou rinite micótica, e a quadros de pneumonia e infecção sistêmica, respectivamente (Malik et al, 2003). No Brasil também já houve relato de criptococose em aves (Raso et al, 2004).

1.1.6- FATORES DE VIRULÊNCIA

Segundo Dolante (2001), os principais fatores de virulência do *Cryptococcus neoformans* que tem sido estudados são a cápsula, a produção de melanina, e a produção de manitol.

O polissacarídeo capsular presente em maior quantidade é o glucuronoxylomanose (GXM), e se constitui num fator de virulência porque o tamanho da cápsula impede a fagocitose. O polissacarídeo capsular impede, também, a migração de leucócitos para o sítio de inflamação aguda e crônica (Dolante, 2001; Fonseca et al., 2004).

A produção de melanina está intimamente relacionada com a virulência da amostra, pois é um polímero inerte, não havendo enzimas capazes de hidrolisá-la ou anticorpos que a reconheçam (Staib et al, 1987 ; Melo et al, 1993). O pigmento melanínico atua como antioxidante e antifagocítico, protegendo a célula contra estresse físico, raios UV, degradação enzimática e ação de agentes químicos diversos, bem como antimicrobianos (Silveira et al. 2004). A melanina evita também a produção de fator de necrose tumoral (TNF) pelos macrófagos (Huffnagle et al, 1996).

A habilidade da levedura produzir manitol tem sido implicada na virulência, pela capacidade do manitol de recolher os radicais livres e desse modo inativar os mecanismos de morte celular (Wong et al, 1990; Chaturvedi et al, 1996).

Outros fatores de virulência a serem considerados são a produção de enzimas como proteases e fosfolipases.

Vidoto et al (1996) estudaram 23 cepas de *Cryptococcus neoformans*, verificando a produção de fosfolipase em 22 cepas e relacionaram a produção com o tamanho das cápsulas das cepas. Vidoto et al, (1998) afirmaram que o tamanho da cápsula parece ter

uma relação com a produção de fosfolipase. Chen et al. (1997), também identificaram a atividade de fosfolipase extracelular, indentificando-a como fosfolipase B, lisofosfolipase e uma lisofosfolipase-transacilase. De acordo com Ganendren et al (2006) a fosfolipase B é importante na infecção pulmonar pelo *C. neoformans*, pois indiretamente facilita a aderência da levedura ao epitélio pulmonar, agindo sobre os substratos do hospedeiro e liberando ácidos graxos, que agem sobre as membranas celulares e no surfactante, expondo sítios de ligação para a levedura aderir.

As proteinases, por sua vez, degradam os tecidos do hospedeiro e destroem proteínas consideradas imunologicamente importantes. O *Cryptococcus neoformans* tem baixa atividade proteolítica, mas estas enzimas podem digerir imunoglobulinas e parte do sistema complemento no local da infecção (Casadevall & Perfect, 1998).

1.1.7- SOROGRUPAGEM

Segundo Melo et al (1993) a descoberta da capacidade do *C. neoformans* assimilar a creatinina como fonte de nitrogênio e a produção de melanina, possibilitaram grande avanço na quimiotipagem dessa levedura.

Kwon-Chung et al (1978), foram os primeiros a descreverem uma técnica rápida, simples e acurada para tentar diferenciar as variedades através da quimiotipagem em meio de cultura, contendo creatinina, dextrose e azul de bromotimol como indicador de pH (Ágar CDB).

Polacheck e Kwon-Chung (1980) estudaram a base bioquímica da variação da cor do meio, e concluíram que na variedade *gattii* ocorre produção de amônia, a partir da

degradação da creatinina por ação da creatinina deiminase, resultando em metilhidantoína e amônia, tornando o meio alcalino e fazendo com que ele passe da cor amarela para azul. Este fato não ocorre com as demais variedades.

Salkin e Hurd (1982) desenvolveram um novo meio para diferenciar as variedades de *C. neoformans*, o GCP (glicina-ciclohexamida-vermelho de fenol). Os sorotipos A e D são inibidos pela ciclo-hexamida, enquanto que a variedade *gattii* cresce, tornando o meio róseo-pardo. Melo et al, (1993) afirmam que resultados negativos são observados em cerca de 10% da variedade *gattii*.

Kwon-Chung et al, (1982) descreveram outro meio a base de L-canavanina, glicina e azul de bromotimol(CGB), verificando que todas amostras da variedade *gattii* utilizavam a glicina como fonte de carbono e nitrogênio, resistindo à L-canavanina. A amônia liberada durante a clivagem da glicina é a responsável pela reação positiva e o indicador torna a cor do meio azul-cobalto na variedade *gattii*.

A L-canavanina atua como uma droga, inibindo o crescimento dos sorotipos A e D. Porém 60% das cepas desses sorotipos são resistentes a L-canavanina e, contudo não assimilam a glicina presente no meio. Desta maneira impede-se o crescimento de 100% das cepas do sorogrupo AD (Perez et al, 2003). De acordo com Melo et al, (1993) este meio mostrou-se superior aos dois anteriores.

1.2- *Periplaneta americana*

Figueiredo (1998) relata que de acordo com muitos pesquisadores, o registro de inseto fóssil mais antigo é um exemplar de barata, a *Paleoblatta douvillei*, pertencente à era paleozóica do sistema Siluriano, o que significa cerca de 350 milhões de anos ou 100 vezes mais antiga que o homem. São consideradas pragas de navios e, no século XVI, na época das grandes navegações, o método adotado para o controle de baratas em um navio japonês ficou conhecido como “shore leave for cockroaches”, que consistia em um dia em terra firme para aquele marinheiro que capturasse 300 exemplares de baratas. O interesse científico pelas baratas é relativamente recente. A barata de esgoto, por exemplo, é usada em escolas e universidades como modelo de estudo sobre anatomia e fisiologia de insetos, na cadeira de entomologia.

Os blatódeos são insetos cosmopolitas, com mais de 4.000 espécies viventes catalogadas no mundo, sendo um terço dessas, habitantes das regiões neotropicais. A maioria é silvestre e de hábitos diurnos. Apenas 1% dos blatódeos apresenta associação com o homem e “status” de praga, possuindo hábitos noturnos e alimentação onívora (Vianna et al., 2001).

Os blatódeos estão entre os insetos de maior capacidade de adaptação, atribuída a uma combinação de características como alimentação onívora, grande potencial reprodutivo e também hábitos absconditos que os protegem da detecção e destruição (Guimarães, 1984). O mesmo autor menciona, ainda, que os gêneros de maior importância sanitária pertencem a três famílias: Blattidae (*Blatta e Periplaneta*), Blatellidae (*Blatella e Supella*) e Blaberidae (*Blaberus, Pycnoscellus e Leucophaea*).

As baratas são onívoras e se alimentam de uma grande variedade de materiais, preferencialmente que contenham amido e açúcares. Ingerem leite, queijo, carnes, grãos, açúcar, chocolate, doce, entre muitos outros produtos. Praticamente nenhum material comestível que o homem pode ingerir está isento da possibilidade de contaminação por estes insetos, que também se alimentam do papel de livros, de outras baratas mortas ou feridas, sangue fresco ou seco, excrementos, unhas das mãos e pés, cadáveres e detritos alimentares que ficam na boca. Possuem, segundo Ponce et al. (2005), predileção por comidas fermentadas.

Appel e Rust (1985) mencionaram que 12 espécies de blatódeos, dentre esses, *Periplaneta americana*, causam sérios problemas à saúde pública, devido ao comportamento sinantrópico, habitando o domicílio e o peridomicílio.

Os blatódeos sinantrópicos podem atuar como transmissores e também como reservatórios de agentes patogênicos, determinando sua importância na saúde pública. Desta forma, *P. americana* foi objeto de vários estudos referentes à condição de vetor e/ou reservatório de agentes patogênicos, sendo identificadas várias espécies de protozoários (Pérez, 1989). Guthrie e Tindall (1968) citaram cerca de 60 espécies de fungos associados a blatódeos, alguns que causam doenças ou morte a esses, e outros patogênicos para vertebrados.

Harwood e James (1979) mencionaram que os blatódeos sinantrópicos são importantes vetores mecânicos de patógenos, sendo hospedeiros intermediários de vários helmintos parasitas do homem, bem como, registraram o envolvimento desses, em alergias no homem. Chinchilla e Ruiz (1976), na Costa Rica, relataram que três espécies de baratas *Periplaneta australasiae*, *P. americana* e, particularmente, *Leucophaea maderae*, ao ingerirem fezes de gatos infectados, podem veicular o *Toxoplasma gondii*.

Pérez (1989) relatou que os helmintos representam, depois das bactérias, o grupo de organismos patogênicos aos vertebrados mais importantes transmitidos pelos blatódeos, e também, cita cinco espécies de protozoários, *Balantidium coli*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*. Ponce et al., (2005) relacionam o *Aspergillus niger* com *P. americana* em uma tabela de associação de agentes patogênicos com espécies de baratas de importância em saúde pública.

Prado et al (2002) trabalhando com enterobactérias isoladas de baratas *P. americana* capturadas em hospital, relatam que isolaram em seus processamentos 97% de fungos, mas não mencionam se eram leveduriformes ou filamentosos.

Swinne e Eyckmans (1984), isolaram pela primeira vez *C. neoformans* do conteúdo digestivo de baratas (*Periplaneta americana*), no Zaire. Swinne et al (1986) relataram novamente o isolamento da levedura do conteúdo digestivo das baratas, ocasião em que processaram 113 insetos. Os conteúdos digestivos foram removidos assepticamente por dissecação do inseto, e foram diretamente inoculados em meio seletivo, com incubação a 25°C e leitura depois de 8 dias. O isolamento ocorreu do conteúdo digestivo de duas baratas.

2- OBJETIVOS

2.1- Determinar a presença ou não de *C. neoformans* no conteúdo interno de baratas (*Periplaneta americana*) recolhidas de ambientes públicos.

2.2- Determinar a presença ou não de *C. neoformans* no exoesqueleto de baratas (*Periplaneta americana*) recolhidas de ambientes públicos.

2.3- Verificar a capacidade de produção de protease e fosfolipase, “in vitro”, para as cepas isoladas

2.4- Realizar a sorogrupagem bioquímica das cepas isoladas

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- LOCAIS

Os locais para coleta dos insetos foram escolhidos devido, inicialmente a se enquadrarem na classificação de edificações que permitem o livre acesso ao público. Após isso, avaliamos a presença de fezes de pombos nesses locais. De acordo com Emmons 1955 apud Silva e Paula (1963), o *C. neoformans* pode ser isolado com grande frequência dessas fontes, fato este confirmado por vários autores.

As fezes de pombos, dos locais escolhidos para apreensão de baratas ou de seus arredores, foram recolhidas antes da colocação das armadilhas com o objetivo de se testar a positividade para *Cryptococcus* spp. no local.

Além da positividade das fezes dos locais, foram avaliadas também as condições para a realização do trabalho. Era necessária a colaboração dos gestores de cada local, e de seus funcionários e frequentadores.

Assim, foram escolhidos para a realização desse trabalho, um hospital federal de referência, e uma igreja católica, localizados no município do Rio de Janeiro e dois CIEPs (Centro Integrado de Educação Pública). O primeiro CIEP está localizado no município de Seropédica (CIEP I) e o segundo no município do Rio de Janeiro (CIEP II).

As figuras 1 e 2 mostram, um dos locais de captura com a presença de fezes de pombos.

3.2- OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

A apreensão de baratas vivas ocorreu através do emprego de armadilhas e de capturas diretas com saco plástico. Insetos encontrados já mortos no ambiente selecionado, desde que não houvesse relato de uso de inseticida no local e que se apresentassem intactos quanto à estrutura do seu exoesqueleto, também foram recolhidos.

A captura direta foi feita colocando-se um saco plástico transparente na mão realizando-se então a captura manual dos insetos vivos presentes no local.

As armadilhas eram colocadas em locais escuros, como depósitos, salas de materiais e armários.

Foram utilizados dois tipos de armadilhas. Uma delas foi preparada com caixa de papelão provida de tampa onde, no seu interior, foi feito um tipo de labirinto de papel, fixado na caixa com fita adesiva. O outro tipo de armadilha foi elaborado com garrafa tipo “pet”, descartável, com fita adesiva transparente na abertura, com a parte gomada voltada para o interior, cobrindo apenas metade da área de entrada da mesma. A figura 3 mostra os dois tipos ora descritos.

As armadilhas continham em seu interior um pouco de ração canina, que servia como isca para as baratas e eram estrategicamente dispostas, mensalmente, em locais propensos à existência desses insetos. Nestes locais e nos arredores havia, concomitantemente, fezes de pombos. Quinzenalmente uma vistoria nas mesmas, era realizada, recolhendo-se os insetos apreendidos. A coleta foi realizada no período de maio de 2006 a agosto de 2007.

As baratas foram acondicionadas em potes brancos, de polietileno, descartáveis e com tampa própria, conforme as figuras 4A, 4B e 4C, sendo então, transportadas ao laboratório para serem processadas.



Figura 1: Escadaria de acesso ao telhado do Centro Integrado de Educação Pública, localizado em seropédica (CIEP I), que era utilizado como depósito. Um dos locais de onde foram coletadas fezes e amostras de insetos.



Figura 2: Detalhe da torre da igreja com fezes de pombos. Local selecionado para colocação de armadilha.



Figura 3: Tipos de armadilha: à esquerda a feita com garrafa “pet” e a da direita feita com caixa de papelão.



Figura 4A



Figura 4B



Figura 4C

Figuras 4A, 4B, 4C: Potes em que as baratas capturadas eram acondicionadas para transporte do local de captura até o laboratório, para serem processadas.

3.3- PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

3.3.1- FEZES

O processamento das amostras de fezes coletadas ocorreu no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (LLPA), do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária (DMIV), do Instituto de Veterinária (IV), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

As amostras foram pesadas (20 gramas), e diluídas na proporção de 1:10 em solução salina estéril (0,9%) com cloranfenicol (200mg/L) (anexo1) contida em Erlenmeyer, sendo então homogeneizadas e ficando 30 minutos em repouso, para separação das fases conforme descrito por Baroni et al., (2006).

3.3.2- BARATAS RECOLHIDAS

O processamento dos insetos apreendidos também ocorreu no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (LLPA), DMIV, Instituto de Veterinária, UFRRJ.

As baratas que chegavam vivas ao laboratório, antes de processadas, eram ,como descrito por Prado et al., (2002), imobilizadas a uma temperatura de 0 à 5°C por um período de 5 a 20 minutos.

Após a etapa de imobilização, as amostras eram levadas para a cabine de segurança biológica e colocadas, então, em um frasco de Erlenmeyer contendo 50ml de solução salina (0,9%) acrescida de cloranfenicol de acordo com Baroni et al. (2006). Para cada amostra foi empregado um Erlenmeyer contendo esta solução.

Nessa solução as amostras permaneceram por 10 min, com o intuito de obtermos uma amostra representativa da contaminação do exoesqueleto de cada barata.

Após esse tempo, as baratas foram retiradas dos seus respectivos frascos de Erlenmeyer reservando-se os conteúdos líquidos nos quais as mesmas estavam para posterior semeadura. Os mesmos permaneceram em repouso de 1 hora.

Prosseguindo, os insetos foram passados seqüencialmente para vários frascos Becker contendo seqüencialmente tintura de iodo a 2%, solução salina com cloranfenicol estéril, álcool 70°, solução salina com cloranfenicol estéril e, novamente, solução salina com cloranfenicol estéril. Todo esse processo foi realizado em cabine de segurança biológica classe II. O tempo de exposição em cada solução foi de um minuto. As soluções contidas nos frascos Becker eram trocadas rotineiramente para evitar a turbidez da solução.

Após a realização dessa seqüência de passagens, as baratas eram colocadas em placas de Petri estéreis, onde eram submetidas a um período de 20 minutos, de incidência de luz ultravioleta, com o intuito de completar a eliminação da população microbiana da parte externa dos insetos testados. A partir desse ponto, cada uma das amostras foi colocada em frasco Erlenmeyer contendo 50ml de solução salina (0,9%) com cloranfenicol (200mg/L), para então, procedermos à trituração do inseto. Para tal, utilizamos um bastão de vidro, estéril, agitando-se em seguida, o material em agitador magnético por 10 minutos, conforme preconizado por Baroni (2001). Procedeu-se então o repouso do material por 1

hora, para propiciar sedimentação das partículas mais pesadas e flutuação das possíveis células de *Cryptococcus* spp. (figura 5).



Figura 5: Frasco de Erlenmeyer de 150ml, contendo a barata já triturada e homogeneizada em solução salina, aguardando o tempo de repouso.

3.4- ISOLAMENTO

3.4.1- A PARTIR DE FEZES

Terminado o tempo de espera para sedimentação, uma alíquota de 1mL do sobrenadante foi retirada por pipetador automático calibrado e provido com ponteiros descartáveis esterilizados. Essa alíquota foi semeada com o auxílio de alça de Drigalski, em triplicata, em meio de cultivo com dopamina (anexo 3), contido em placas de Petri descartáveis (Pereira, 2006).

3.4.2- A PARTIR DE BARATAS

A amostra representativa do exoesqueleto (salina 0,9% com cloranfenicol 200mg/L) à qual os insetos foram inicialmente expostos, após o tempo de repouso, foi semeada (1 mL) em triplicata, em meio com dopamina contido em placas de Petri sendo incubadas a 32°C.

Findo o tempo de espera para ocorresse a sedimentação, com o auxílio de um pipetador automático calibrado e ponteiros esterelizados, foi retirada uma alíquota de 0,1mL do sobrenadante das amostras dos insetos. As alíquotas de cada amostra foram semeadas em meios de cultura contendo dopamina (anexo 3). Para uma distribuição uniforme, foram empregadas alças de Drigalski estéreis. Todo o processo foi realizado na cabine de segurança biológica de classe II. A semeadura também foi realizada em triplicata para cada inseto.

Uma placa de Petri, de cada grupo de três do exoesqueleto e de cada grupo de três do conteúdo interno, foram incubadas, sendo uma em geladeira, outra em temperatura ambiente e uma terceira em estufa a 32°C.

A figura 6 representa o fluxograma da metodologia empregada desde a obtenção dos insetos até o isolamento do agente.

Cada vez que os insetos eram processados, realizava-se um grupo controle para se comprovar a eficácia do processo de esterilização. Consistia em separar uma barata, após realizado o processo de degermação do exoesqueleto por completo, colocando-a em placa de Petri em caldo Sabouraud. O caldo proporcionava um contato mais íntimo com a superfície externa do exoesqueleto do inseto.

Esse controle era colocado na estufa a 32°C, com leitura por 15 dias, somente em caso de ausência total de qualquer crescimento, passava-se a computar como válido o resultado das amostras processadas.

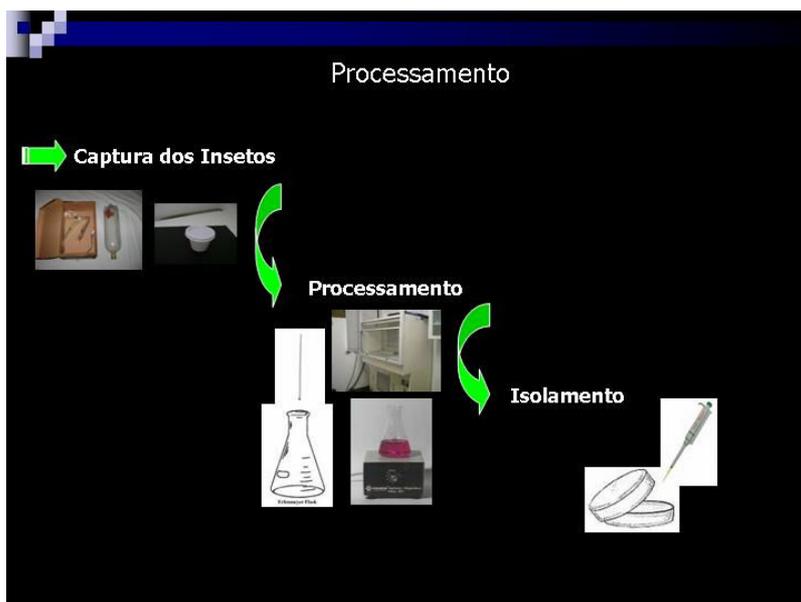


Figura 6: Fluxograma do processamento dos insetos.

3.5- LEITURA DOS ISOLAMENTOS

A leitura foi realizada a partir do terceiro dia após a inoculação, se estendendo até o décimo quinto dia, para as placas de Petri incubadas em temperatura ambiente e em estufa a 32°C.

As placas de Petri que foram incubadas em geladeira, foram após o décimo quinto dia levadas e mantidas em temperatura ambiente, observando-se por mais 7 dias.

Inicialmente eram realizados exames macromorfológicos das colônias isoladas. O meio de cultivo contendo dopamina é diferencial para o *C. neoformans*, revelando colônias com coloração marrom (outras espécies de *Cryptococcus* não formam pigmentos melanímicos neste meio). Colônias com características macromorfológicas compatíveis (cor, consistência, aspecto, forma) (figura 7) eram selecionadas para exame microscópico.

A observação à microscopia óptica foi realizada com objetivas de aumento de 10X, 20X, e 40X, a partir da preparação de lâminas confeccionadas e coradas tanto com nigrosina como com lactofenol de Amann com azul de algodão.

As colônias que micromorfolologicamente apresentaram células com características de *Cryptococcus*, isto é, que se apresentaram como leveduras globosas, ou ovais, aparentemente possuidoras de cápsula, com ou sem brotamento (figura 8), foram suspensas em solução salina estéril e inoculadas novamente em meio contendo dopamina, com o objetivo de se obter colônias verdadeiras, isto é, colônias oriundas de uma única célula, e que pudessem expressar todo seu potencial de produção de melanina (figura 9), sem a interferência de possíveis competidores presentes inicialmente. Esta etapa também permitiu o início dos procedimentos de identificação.

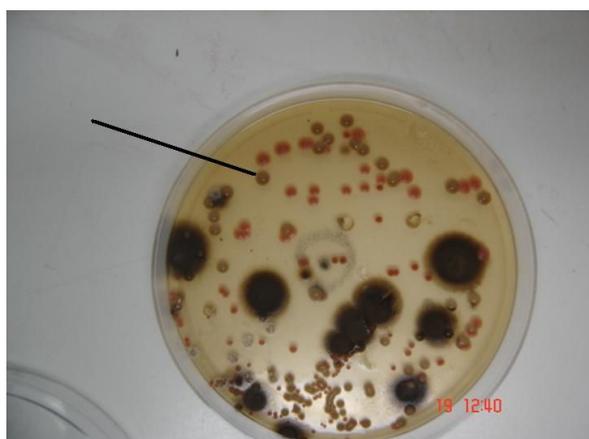


Figura 7: Primo isolamento, em meio com dopamina, de *C. neoformans* (colônias marrons) obtidas a partir da semeadura direta de uma amostra de barata processada.

3.6- IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS

A identificação foi realizada segundo Kurtzman e Fell (1998), prioritariamente, e complementarmente utilizando o protocolo de identificação de leveduras do LLPA (anexo 7). Foram consideradas além das características morfológicas e culturais, as características nutricionais do *Cryptococcus neoformans*, como a assimilação de fontes nitrogenadas e carbonadas, hidrólise de uréia, e fermentação negativa.

Assim sendo, após a obtenção de colônias verdadeiras das amostras suspeitas, foi realizado o teste para urease utilizando o meio Christensen (anexo 4), e também o teste de crescimento negativo em meio contendo ciclohexamida a 0,04% (figura 9).

As colônias positivas para a produção de urease, e com ausência de crescimento em ciclohexamida, na concentração mencionada, foram submetidas à auxanograma, testando-se assimilação de carbono oriunda de diferentes fontes, como, por exemplo, o inositol, rafinose, melibiose, galactose, sacarose, e outros.

O auxanograma realizado para a assimilação de fontes carbonadas foi com Meio Yest Nitrogen Base (YNB) - Difco®, padronizando-se o inóculo de acordo com o grau 4 da escala de Mc Farland. A leitura do teste foi efetuada a partir do terceiro dia até o sétimo dia. A assimilação de fontes nitrogenadas foi realizada em meio Yest Carbon Base (YCB) – Difco®.

Os dados foram anotados no protocolo de identificação do LLPA (anexo 7), para uso nas chaves de identificação de leveduras.

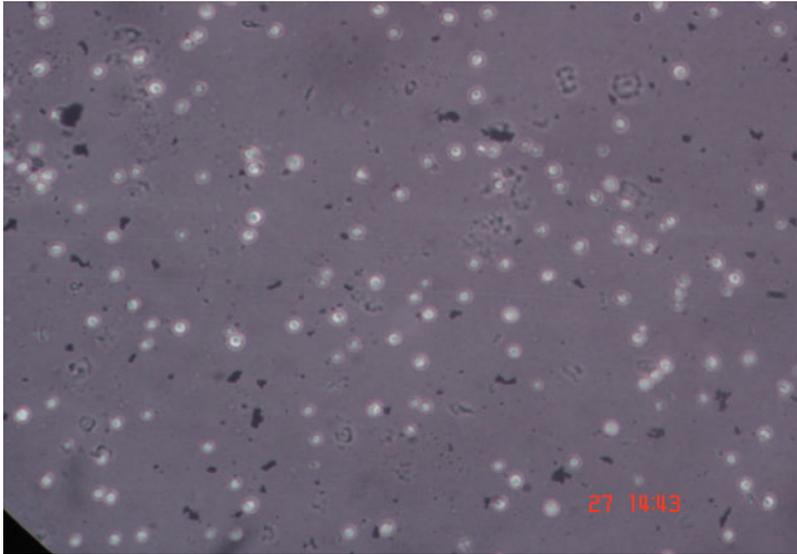


Figura 8: Micromorfologia em lâmina utilizando-se a nigrosina como contraste, evidenciando células de *Cryptococcus* spp. globosas e capsuladas.



Figura 9: Da esquerda para direita: crescimento em meio Saboraand, ausência de crescimento em meio contendo ciclohexamida, crescimento colonial de coloração marrom em meio com dopamina e produção de urease em meio de Christensen.

3.7- SOROGRUPAGEM

Uma vez feita a identificação das cepas isoladas, aquelas caracterizadas como sendo da espécie *Cryptococcus neoformans* foram submetidas à sorogrupagem em meio CGB (anexo5), como sugerido por Kwon-Chung et al (1982).

Para identificação dos sorogrupos, as cepas foram previamente repicadas e incubadas em estufa a 32°C por 48horas em meio Sabouraud dextrose a 4% (anexo2). Após crescimento, foram semeadas em um ponto único no centro de placas de Petri contendo o meio CGB (anexo 5) (figura 10). Todo procedimento de inoculação nas placas foi realizado em cabine de segurança biológica classe II.

Os testes foram realizados em duplicata com incubação, também, em 32°C, com leituras diárias, até o sétimo dia, observando-se a ocorrência ou não de crescimento e mudança ou não da coloração para o azul.

Foi realizado um grupo controle desse procedimento, onde utilizamos as cepas USP 160; USP 161; USP 162 como padrões dos sorotipos “A”, “B” e “C” respectivamente.



Figura 10: Sorogrupagem em meio CGB. A Placa com coloração azul cobalto é o controle positivo para o sorogroppo BC.

3.8- FATORES DE VIRULÊNCIA

3.8.1- PRODUÇÃO DE FOSFOLIPASE

O teste de produção de fosfolipase foi realizado como proposto por Price et al., (1982), onde foi utilizado meio que apresenta gema de ovo e CaCl_2 em sua composição denominado meio para produção de fosfolipase (anexo 6).

As amostras, antes do teste foram previamente repicadas em meio Sabouraud dextrose 4%, efetuando-se o teste, a partir dessas amostras ativadas.

As amostras foram semeadas assepticamente em um ponto único, central, na superfície do meio ágar fosfolipase nas placas de Petri.

Após semeadas, as amostras foram incubadas em estufa a uma temperatura de 32°C. As leituras foram realizadas do 3° ao 15° dia.

As amostras produtoras de fosfolipase produzem um halo de precipitação ao redor da colônia, formado devido à deposição de cloreto de cálcio (Figura 11). O valor da atividade fosfolipásica (Pz) foi medido pela razão do diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro formado pela colônia mais a zona de precipitação (dcp).



Figura 11: Halo de precipitação ao redor da colônia inoculada centralmente na placa de Petri, em meio para produção de fosfolipase.

Após a observação visual da zona de precipitação, foram aferidas, com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, as medidas dos dc e dcp para se efetuar o cálculo da atividade enzimática. Os valores obtidos foram comparados com a tabela 1 para classificação das amostras como positiva, forte positiva ou negativas.

Tabela 1 – Atividade enzimática de protease e fosfolipase de levedura, padronizadas de acordo com Price et al, 1982

| Pz | Atividade Enzimática | Código |
|--------------|----------------------|--------|
| = 1,0 | Negativa | 1 |
| ≥ 0,64 < 1,0 | Positiva | 2 |
| < 0,64 | Fortemente Positiva | 3 |

O teste de produção de fosfolipase foi realizado com as amostras isoladas dos insetos e também com amostras isoladas dos ambientes de coleta, com o intuito de se estabelecer uma comparação entre essas amostras.

3.8.2- PRODUÇÃO DE PROTEASE

Segundo o estabelecido por Ruchel et al, (1982) a produção de protease foi realizada utilizando-se um meio de cultura (anexo 8) que contém uma parte básica que é esterilizada por autoclavação, e uma outra parte que contém soroalbumina bovina esterilizada por filtração em membrana de Millipore 0,22 μ .

As amostras testadas foram previamente repicadas em meio Sabouraud dextrose 4% (anexo 2) para ativação. Após este cultivo, a semeadura deu-se em ponto único central, na superfície do meio contido em cada placa de Petri, tendo-se o cuidado de realizar esse procedimento assepticamente. Todas as cepas foram testadas em triplicata e incubadas a 32°C com leituras do 3º ao 15º dia.

A produção de protease se torna perceptível através da formação de um halo ao redor da colônia que é formado pela proteólise. A atividade proteolítica enzimática (Pz) da cepa testada pode ser estimada pelo cálculo da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro formado pela colônia e a zona de degradação (dcp).

Após a observação visual da zona proteolítica, foram aferidas, com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, as medidas dos dc e dcp para se efetuar o cálculo da atividade enzimática. Os valores, como na técnica anterior, foram comparados com a tabela 1.

O teste de produção de protease foi realizado com as amostras isoladas dos insetos e também das amostras isoladas dos ambientes de coleta, objetivando-se a comparação entre essas amostras.

3.9- PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de *C. neoformans* identificadas e isoladas, foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose 4%, contido em tubos de ensaio em camada alta, e incubadas por 72 horas para obtenção de colônia com grande massa de células.

Em seguida, os tubos foram identificados de acordo com a origem e data de processamento e mantidas sob refrigeração no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (LLPA), DMIV, Instituto de Veterinária, UFRRJ.

4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1- COLETA DE FEZES DE POMBOS

Os resultados obtidos a partir do processamento das fezes de pombos recolhidas em locais públicos podem ser visualizados na tabela 2 abaixo. Estes resultados serviram inicialmente de base para seleção do local para captura dos blatódeos.

A metodologia utilizada para processamento já havia sido descrita por Montenegro e Paula., (2000), Baroni et al., (2006) e Pereira, (2006) no processamento do mesmo tipo de material. E assim, como constatado por esses pesquisadores, essa metodologia demonstrou ser eficiente.

Tabela 2: Isolamento de *Cryptococcus neoformans* oriundos de fezes de pombos, nos locais selecionados para captura dos insetos.

| Local | Isolamento <i>Cryptococcus</i> |
|----------|--------------------------------|
| CIEP I | Positivo |
| CIEP II | Positivo |
| IGREJA | Positivo |
| HOSPITAL | Positivo |

Fonte: Dados Primários

A determinação de positividade dos locais escolhidos para captura foi importante para que não ocorresse um viés na análise dos resultados obtidos do processamento das baratas capturadas nesses locais. Se os locais escolhidos para coleta fossem negativos para *C. neoformans*, os insetos capturados nesses locais teriam grande probabilidade de serem negativos também.

4.2- COLETA DE AMOSTRAS

A escolha dos locais para captura se deu primeiro pelo fato deles se enquadrarem na classificação de edificações públicas de livre acesso ao público. Além disso foi levado em consideração as condições para a realização do trabalho, pois como dito por Vianna et al., (2000) as baratas *Periplaneta americana* fazem parte do 1% de blatódeos que tem hábitos noturnos. Assim, fazia-se necessária a colaboração dos responsáveis pelos locais para que as armadilhas, depois de colocadas, não sofressem interferências (como mudanças de local por exemplo) e se estas fossem inevitáveis, que fossem as menores possíveis.

Devido a isso, foi feita a escolha do CIEP (Centro Integrado de Educação Pública) nos municípios do Rio de Janeiro, e Seropédica, da igreja católica, e do hospital federal de referência, estes últimos localizados no município do Rio de Janeiro. Nesses locais escolhidos tivemos a colaboração plena dos funcionários e responsáveis do local, tanto na ajuda da colocação das armadilhas como também no compromisso de não modificar a posição das mesmas e, ainda, minimizando a passagem pelos locais onde as armadilhas foram colocadas, evitando, assim, que os insetos fossem afugentados.

Foram apreendidos 150 insetos no total, todos pertencentes ao gênero *Periplaneta* e espécie *P. americana*, dos quais 54 foram capturados no CIEP do município de Seropédica (CIEP-I), 42 no CIEP do município do Rio de Janeiro (CIEP-II), 33 na Igreja e 21 no Hospital, como constata-se na figura 12.

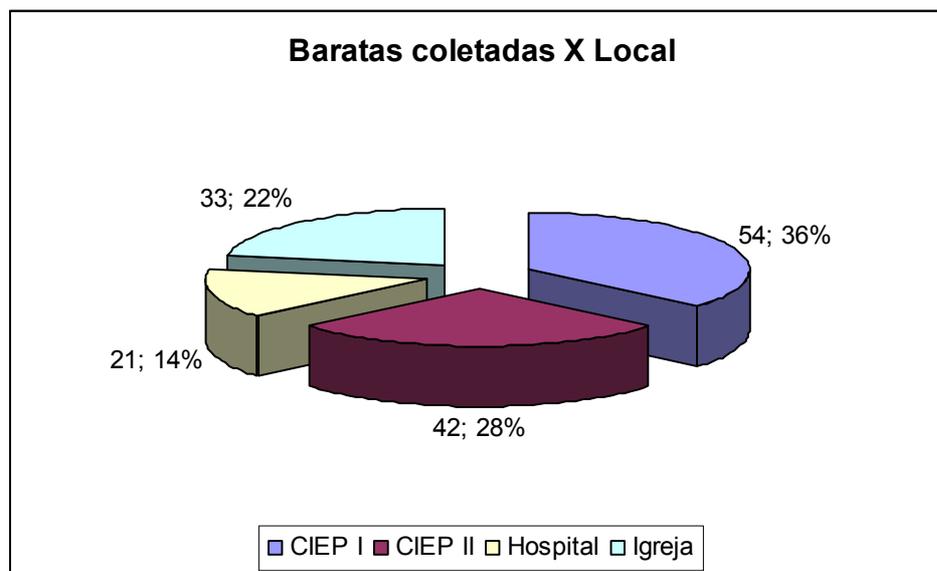


Figura 12: Total das amostras coletadas e respectivas porcentagens de cada local de coleta.

O menor número de baratas capturadas no hospital se deve provavelmente por haver neste local uma movimentação constante, tanto diurna quanto noturna, de pessoas. Além deste fato, é um local que, com uma certa rotina, é dedetizado. Tal fato difere da igreja e dos colégios, que não sofrem com a movimentação das pessoas durante toda a noite, e também não possuem em geral uma preocupação de seus gestores com a dedetização do recinto.

Quando propusemo-nos a realizar este trabalho, não possuíamos referência a ser seguida com relação à armadilha para captura de baratas, a não ser o uso de rede entomológica (Vianna et al., 2001) e o uso de vidros providos de tampa submetidos previamente à desinfecção com álcool (Prado et al., 2002). No entanto Prado et al., (2002) não informam o procedimento para captura. Estes fatos nos fizeram elaborar dois tipos de armadilhas.

Quanto aos dois tipos de armadilhas empregadas para a captura dos insetos, pode-se considerar o seguinte. O primeiro tipo de armadilha, feita com a caixa de papelão com

tampa e um labirinto preparado com fita de jornal, se apresentou menos eficiente do que a armadilha feita com garrafa descartável tipo “pet” com fita gomada no orifício de entrada. Para que as armadilhas feitas com caixa de papelão funcionassem, havia a necessidade de serem colocadas durante o dia, permanecendo abertas por, pelo menos, uma noite. Com isto, os insetos em estudo, de hábitos noturnos, entravam. O fechamento era feito no dia de nova visita ao estabelecimento. No entanto, ao fechar, não era possível verificar o número de baratas e não havia possibilidade de controlar possíveis saídas de insetos que tivessem entrado. Com relação à armadilha feita com garrafa “pet”, tínhamos a certeza que todas as baratas que entram na garrafa, não conseguiam sair, pois ficavam presas na parte colante da fita adesiva transparente.

O uso de sacos plásticos transparentes não deve ser recomendado, pois embora eficiente, as baratas, ao serem capturadas, tinham o reflexo de defecar, diminuindo assim o volume do conteúdo intestinal desses animais, o que poderia influenciar nos isolamentos.

Considerando os tipos de captura (sacos plásticos, caixa de papelão, garrafa pet e captura de baratas mortas), podemos verificar que o número de insetos capturados mortos é superior ao número de insetos vivos capturados por cada um dos métodos. Este fato pode ser verificado na tabela 3. A coleta de insetos mortos deu-se ao longo de todos os meses em que efetuamos capturas de insetos.

A captura realizada utilizando-se garrafas “pets” veio em segundo lugar, em número de insetos obtidos, com a ressalva que o seu emprego deu-se a partir do quinto mês. A captura direta com saco plástico foi o terceiro método onde mais se apreendeu amostras de *Periplaneta americana*. Esse número de captura, no entanto, se deu principalmente nos meses de novembro, dezembro e janeiro. A armadilha feita com caixa de papelão apreendeu apenas nove exemplares de barata e foi utilizada ao longo de todos os meses.

Nossos métodos de captura diferiram do utilizado por Vianna et al., (2001) que utilizaram apenas rede entomológica. Contudo aqueles pesquisadores queriam analisar o desenvolvimento e a longevidade dessa espécie de barata e não visavam isolamento de qualquer microorganismo.

Com relação ao número de exemplares obtidos, pode-se dizer que outros pesquisadores trabalharam com amostragem próxima da obtida neste trabalho. Prado et al., (2002) para o isolamento de enterobactérias nesta mesma espécie, capturadas em um hospital brasileiro, utilizaram em seu trabalho um total de 103 baratas vivas.

Swinne et al., (1986) não relatam no seu trabalho como as baratas foram capturadas, nem se as mesmas foram capturadas vivas ou mortas, mas informam que processaram 113 baratas, da espécie estudada, que viviam no ambiente doméstico das casas de pessoas sem histórico de Cryptococose e AIDS.

Há que se compreender, em todos os casos, as dificuldades inerentes à captura.

Tabela 3: Quantidade de baratas capturadas pelos diferentes métodos aplicados.

| Método de captura | Nº de baratas capturadas |
|---|--------------------------|
| Insetos capturados mortos | 67 |
| Armadilha feita com garrafa “pet” | 43 |
| Captura direta com saco plástico | 31 |
| Armadilha de caixa de papelão com tampa | 9 |
| Total | 150 |

Fonte: Dados Primários

Vale ainda ressaltar que a maioria das amostras coletadas se deu nos meses de novembro e dezembro de 2006, e janeiro e fevereiro de 2007, como é mostrado pela tabela 4. Estes dados coincidem com o que Vianna et al, (2001) constataram em seu estudo, onde

avaliaram a influência da temperatura no desenvolvimento e na longevidade da *Periplaneta americana* e concluíram que 30°C é a temperatura ótima para esses insetos. Portanto justifica-se o fato de obter-se uma maior quantidade de baratas capturadas nos meses mais quentes do ano e uma menor quantidade de insetos coletados nos meses mais frios.

A tabela 4 mostra que a coleta de amostras iniciou-se em maio de 2006 e estendeu-se até agosto de 2007. Outro fator que poderia ter influenciado no baixo número de insetos capturados nos primeiros cinco meses, foi o fato de, nesse início de trabalho, ter sido utilizado como método de captura apenas a armadilha construída com a caixa de papelão. Porém, nos mesmos meses do ano seguinte, o número de insetos capturados também foi pequeno, mesmo empregando-se todos os métodos de apreensão citados. Isto sugere que a temperatura, realmente, influencia positivamente na reprodução e desenvolvimento das baratas *Periplaneta americana* e, assim torna-se um fator de extrema importância, afetando diretamente o número de baratas capturadas.

Tabela 4: Quantidade de baratas coletadas de acordo com o mês e ano da coleta.

| Mês e Ano | Número de exemplares |
|--------------|----------------------|
| mai/06 | 5 |
| jun/06 | 4 |
| jul/06 | 0 |
| ago/06 | 0 |
| set/06 | 0 |
| out/06 | 14 |
| nov/06 | 17 |
| dez/06 | 23 |
| jan/07 | 24 |
| fev/07 | 23 |
| mar/07 | 12 |
| abr/07 | 8 |
| mai/07 | 6 |
| jun/07 | 5 |
| jul/07 | 4 |
| ago/07 | 5 |
| Total | 150 |

Fonte: Dados Primários

4.3- PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS:

Os insetos capturados vivos foram imobilizados por uso de frio, sendo submetidos a uma temperatura de 0 a 5°C conforme descrito por Prado et al., (2002), mas vale salientar que apesar destes autores trabalharem com baratas, tinham por objetivo o isolamento de bactérias. Em nosso trabalho, mesmo pesquisando-se uma levedura, a mesma técnica de imobilização foi utilizada, uma vez que Stokes (1971) afirma que as leveduras são resistentes às baixas temperaturas observadas na refrigeração.

Swinne et al., (1986), trabalhando com pesquisa de *Cryptococcus neoformans* em *Periplaneta americana* realizaram a remoção asséptica, por dissecação, do tubo digestivo da barata e inoculação direta em meio seletivo.

Por dificuldades técnicas para a realização da dissecação dos insetos, adaptamos as técnicas utilizadas por Prado et al (2002), que utilizavam os insetos inteiros, com a técnica utilizada por Montenegro e Paula (2000), Baroni et al (2006) e Pereira (2006), que isolaram a levedura de excretas de pombos. Costa et al (2007) ao procederem ao isolamento de *C. neoformans* do Arthropoda *Armadillidium vulgare*, vulgarmente conhecido como tatuzinho, maceraram e diluíram o inseto em solução fisiológica com antibiótico e em seguida semearam em meio diferencial Agar Semente de Niger, técnica similar a utilizada nesse trabalho.

O tempo de espera para sedimentação utilizado nesse trabalho diferiu do utilizado por Baroni et al (2006). Optamos por acrescer o período de repouso em trinta minutos. Esse tempo de repouso maior provavelmente é mais eficiente para o trabalho com insetos, pois

passado o tempo de uma hora, há formação bem definida das duas fases na suspensão, com maior probabilidade das leveduras se localizarem no sobrenadante da suspensão.

Outros autores ao trabalharem no isolamento de *C. neoformans*, utilizando técnicas que empregavam a agitação e um posterior repouso do material, optaram por tempos diferentes para a sedimentação. Pereira (2006) trabalhou empregando trinta minutos de repouso. No entanto para o tipo de material por ele processado (fezes de aves), este tempo foi adequado, pois a probabilidade de existir um grande número de células em excretas aviárias é maior, e há uma maior chance de isolamento. Campos (2006) por trabalhar com cérebro de animais com sintomatologia nervosa, optou por um período de duas horas. Neste caso específico, acredita-se que o número de células, quando presente, fosse bem menor que o encontrado em excretas. Daí, a necessidade de um maior tempo para permitir que as possíveis células ficassem sobrenadantes. No presente trabalho, optamos por uma hora de repouso, considerando a possibilidade de existência de células de *C. neoformans* carregadas externamente ou internamente por baratas, mas considerando que existem poucos relatos de isolamento.

Neste trabalho também foram utilizadas baratas que no momento da coleta se apresentavam mortas, desde que estivesse mantida a integridade do exoexqueleto desses insetos. Para tal foi realizada uma análise visual. Nos dois únicos isolamentos publicados de *Cryptococcus neoformans* oriundos de *Periplaneta americana* não houve relato se as baratas foram capturadas vivas ou coletadas mortas. Contudo pelos resultados obtidos nesta pesquisa e comparando-os com os resultados de Swinne et al (1986) pode-se pensar que o fato de coletarmos também insetos que já se encontravam mortos no ambiente não teve influência significativa na pesquisa. Afirmamos tal fato considerando o número de isolados. Com relação a um maior ou menor isolamento de animais vivos ou mortos, sem dúvida,

cabem considerações. É possível que o número de isolamentos fosse maior que o obtido no presente trabalho se tivéssemos trabalhado somente com insetos capturados vivos. Porém, se considerarmos que há uma competição entre microorganismos, inclusive com a produção de micocinas e bacteriocinas, há também a possibilidade que o inverso seja verdadeiro. O animal morto, sem ingestão de nutrientes que poderiam servir aos microorganismos componentes de sua biota, poderia implicar na eliminação de alguns grupos microbianos facilitando a sobrevivência de leveduras.

O processo desenvolvido para eliminação dos microorganismos contidos no exoesqueleto mostrou-se eficiente, pois não houve crescimento de qualquer microorganismo nas amostras controles. Os resultados obtidos no isolamento proporcionaram, também, ferramentas para se afirmar que o processo de esterilização do exoesqueleto das baratas não influencia o isolamento da levedura pesquisada. O processo que utilizamos de várias passagens em salina com cloranfenicol, solução de iodo e álcool poderia favorecer a penetração destas substâncias e a eliminação do agente encontrado no conteúdo interno das baratas.

Baroni et al., (2006) utilizaram tintura de iodo a 0,8% para eliminar microorganismos presentes na superfície externa de ovos de pombos, submergindo-os nesta solução por 10 minutos e posteriormente em solução salina estéril. Procedimento semelhante ao utilizado nesse trabalho.

4.4- ISOLAMENTO E LEITURA

O isolamento feito direto em placas de Petri contendo meio com dopamina, é de uso muito interessante, uma vez que como relatado por Kurtzmann e Fell (1998) esse meio se comporta como diferencial para *Cryptococcus neoformans*. Na rotina de um projeto de pesquisa, este fato é muito útil, pois agiliza o trabalho, limitando os testes de identificação necessários, apenas às colônias com aspecto e coloração características desse agente.

As placas que foram semeadas com uma alíquota da suspensão do exoesqueleto apresentaram crescimento principalmente de fungos filamentosos, que não são objeto de estudo deste trabalho. Embora não fosse do nosso interesse direto, foi realizada uma triagem pelo exame macromorfológico e em alguns casos, exames micromorfológicos utilizando-se coloração com lactofenol de Amann com azul de algodão, ou clarificação com KOH (30%).

Através da confecção de lâminas podemos afirmar com ampla margem de segurança que, dentre os fungos filamentosos que tiveram crescimento, dos semeados de exoesqueleto, o mais freqüente foi *Aspergillus* spp. Porém não podemos fazer um cálculo da porcentagem desse fungo em relação às demais espécies de fungos filamentosos, pois não foi feita identificação de gênero em todas as placas. Se tal cálculo fosse realizado, teríamos arbitrado valores. Tal constatação vai de acordo com o relatado por Ponce et al (2005), que afirmam que fungos *Aspergillus niger* são os agentes patogênicos mais ligados às baratas *Periplaneta americana*.

O tempo de incubação de 72 horas após inoculação em meio contendo dopamina, para então se iniciar a leitura foi considerado satisfatório. Dificilmente há surgimento de colônias do agente antes desse período. No entanto muitas colônias bacterianas surgem

rapidamente, já nas primeiras 24 – 36 horas. Um tempo superior a 72 horas para o início das leituras também é prejudicial, uma vez que muitos filamentosos, além das bactérias, surgem e ocupam o espaço físico da placa. A observação do material por no mínimo 15 dias, permitiu a observação de que a cor marrom das colônias nem sempre era evidente nos primeiros dias. Essa coloração era visualizada melhor no decorrer desse tempo de visualização. As placas que foram incubadas inicialmente sob refrigeração, mesmo tendo crescimento sob a ação do frio, só mudaram a coloração da colônia quando eram colocadas em temperatura ambiente. Já o aspecto mucóide das colônias foi observado logo no primeiro sinal de desenvolvimento da mesma.

A incubação em temperatura baixa demonstrou ser uma ferramenta técnica muito útil na determinação de *Cryptococcus neoformans* oriundos de baratas. Como relatado por Ponce et al., (2005), esses insetos podem carrear muitos microorganismos, e esta temperatura demonstrou ser capaz de inibir esses microorganismos contaminantes que dificultam o isolamento. Em muitos dos isolamentos, as placas mantidas em ambiente ou a 32°C apresentavam grande números de fungos filamentosos.

Maldonado et al., (2001) concluíram, em seu trabalho, que o crescimento excessivo de outras espécies de leveduras pode impedir o crescimento de *Cryptococcus neoformans*. No presente trabalho, além das cepas de *C. neoformans*, houve o isolamento de outras leveduras, que se encontram em processo de identificação. Logo, levanta-se a hipótese de que essas leveduras também possam ter interferido no baixo número de isolamentos do agente objeto deste estudo.

Há uma possibilidade de interferência nos isolamentos, promovida por *Rhodotorula* spp. Esta levedura, também Cryptococaceae apresenta muitas características do agente em estudo e é freqüentemente isolada de fontes ambientais. No presente trabalho, ocorreram

vários isolamentos da mesma. Neste caso, há a probabilidade de produção de micocinas que interviram causando a inativação de células de *C. neoformans*.

A interferência de contaminantes no crescimento do agente pesquisado pode ser comprovada quando se analisa os resultados de isolamento, e se constata que em 3 das 5 amostras que tiveram crescimento do agente, se observou o crescimento apenas de contaminantes nas placas incubadas em temperatura ambiente. Esta temperatura é ideal para crescimento de diversas espécies de fungos.

Outro fator que também pode influenciar o baixo número de isolamento da levedura pesquisada, nos insetos, é o fato desses terem um pequeno volume intestinal. Proporcionalmente, a quantidade de fezes contidas no trato intestinal de baratas é muito inferior às quantidades de fezes de pombos que são utilizadas em isolamentos. O que se observa na literatura é que a maioria dos pesquisadores como Machado et al.,(1993), Baroni et al.,(2006), Pereira (2006) e Grover et al.,(2007) utilizaram de 5g à 30g do substrato pesquisado. Outro ponto que também influencia é o fato desses insetos serem onívoros. Assim muitos insetos coletados podem ter utilizado outra fonte para se alimentarem que não seja necessariamente uma fonte que funcione como reserva de *C. neoformans*. Há também a possibilidade de, no momento da captura, alguns insetos não estarem com o trato digestivo cheio.

Foram obtidos, nesse trabalho, cinco isolamentos de *C. neoformans*. Observando o total de baratas processadas, nós obtivemos 3,0% de isolamento(5 isolados num total de 150 processados). Essa porcentagem se apresenta quase duas vezes maior do que a obtida por Swinne et al., (1986) que obtiveram uma porcentagem de isolamento aproximadamente igual a 1,77%.

Ainda analisando os resultados, nota-se que os isolados se deram principalmente das amostras oriundas do CIEP I, que teve 60% do total dos isolamentos do agente, oriundos de baratas. Sendo assim há a hipótese de que as crianças e profissionais que frequentam essa instituição estão sob um risco potencial. Para endossar essa hipótese, pode-se ainda considerar a proximidade da escada que dá acesso ao telhado, local onde coletamos os insetos e as fezes de pombos, com as salas de aula. Todas ficam no mesmo corredor uma ao lado da outra no segundo andar do prédio.

Essa observação é importante, mesmo que Fernandes et al., (2000) tenham relatado que a frequência da criptococose em crianças seja baixa. Pode-se levar em consideração em nossa análise, o exposto por Rozenbaum e Gonçalves (1994), que defendem que a exposição ao agente normalmente ocorre quando os indivíduos ainda são jovens, havendo reativação da infecção latente na idade adulta. Há que se pensar que, em qualquer ambiente público, podem circular pessoas que apresentem alguma imunodeficiência, seja temporária ou de caráter crônico. No caso de escolas, existe um contato quase que permanente de crianças, professores e funcionários com uma situação que pode implicar em exposição ao agente.

Passoni et al., (1999) observaram que os pacientes com SIDA possuíam uma chance duas vezes maior de se contaminar com *C. neoformans*, quando essa levedura era isolada do ambiente domiciliar.

Essa proximidade do fungo com os frequentadores desses ambientes é um fator relevante, não só em escolas mas principalmente em hospitais. Mesmo não se isolando o agente dos insetos coletados nesse local, a positividade desse complexo de atenção à saúde foi constatada. Outros pesquisadores, como Silva et al., (2007) isolaram a levedura do

ambiente peri-hospitalar em Minas Gerais e Egres et al., (2007) que isolaram o agente de fontes ambientais do serviço de saúde de Porto Alegre.

4.5- IDENTIFICAÇÃO

Conforme o protocolo de identificação empregado, foi realizado o teste de produção de urease em meio Christensen (anexo 4) que demonstrou de forma qualitativa a produção em todos os isolados. Este fato é importante, pois embora a hidrólise da uréia seja uma das provas auxiliares na identificação de *C. neoformans* a literatura cita que um pequeníssimo percentual das cepas pode ser negativo (Bava et al., 1993).

Apesar do caráter qualitativo deste teste, neste trabalho, pode-se constatar que todas as cepas promoveram a reação nas primeiras 48 horas, demonstrando um grau de coloração bem intenso. É sabido que as cepas variam com relação ao grau de produção de urease. Este é um dado importante e, acreditamos, deve ser levado em consideração em outros estudos, uma vez que a enzima urease é também considerada um fator de virulência.

As fontes assimiláveis pelas cepas através do auxanograma foram a galactose, maltose, rafinose, xilose, arabinose, D-glicosamina, n-acetil-glicosamina, inositol.

A constatação da ausência de crescimento em meio ciclohexamida a 0,4%, os testes positivos para produção de urease, os testes negativos de fermentação, acrescidos das provas de auxanograma fizeram-nos concluir que as amostras suspeitas tratavam-se realmente de *Cryptococcus neoformans*.

4.6- SOROGRUPAGEM

4.6.1- CEPAS ORIUNDAS DAS FEZES

As cepas USP 161 e USP 162 utilizadas como controle positivo, correspondentes aos sorogrupos B/C transformaram o meio CGB, crescendo no mesmo e modificando a coloração para azul cobalto. Já as cepas isoladas de fezes dos ambientes escolhidos para captura dos insetos, foram todas incapazes de crescer no meio, igualmente observado com a cepa USP 160, utilizada como padrão para o sorogrupo AD.

4.6.2- CEPAS ORIUNDAS DE BARATAS

As demais amostras por nós isoladas, não cresceram no meio CGB. Deste modo, podemos afirmar que as amostras isoladas dos insetos coletados nos colégios, no hospital, e na igreja pertencem ao sorogrupo AD, correspondendo às variedades *neoformans* e *grubii*. No Brasil e no mundo, as cepas isoladas de casos clínicos são predominantemente pertencentes ao sorogrupo AD (Shimizu et al., 1986; Rinaldi et al., 1986; Rozenbaum et al., 1990; Mitchell e Perfect, 1995).

Para as amostras ambientais, verifica-se também uma prevalência de sorogrupo AD e especificamente do sorotipo A. A sorogrupagem que realizamos, encontra relação com os dados já verificados por outros autores. Montenegro e Paula (2000) ao estudarem isolados de *C. neoformans* do Parque do Ibirapuera verificaram a presença das duas variedades

(*neoformans e gattii*) simultaneamente. Reimão et al (2007), trabalhando com o *C. neoformans* isolado de árvores e verificando os sorotipos mediante uso de PCR verificou que 2 das 54 amostras pertenciam ao sorotipo A. Abegg et al (2006) verificaram 87% das cepas isoladas de pássaros pertencente à variedade *grubii* sorotipo A.

Kobayashi et al (2005) relataram o isolamento de *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) em 20,3% de amostras de fezes de pombos e em 14,3% de amostras obtidas de *Eucalyptus*.

Carvalho et al (2007) verificaram que todas as amostras isoladas de fezes de pombos em uma área rural da região de Alfenas – MG, pertencem ao sorotipo A.

4.7- FATORES DE VIRULÊNCIA

Foram avaliadas apenas a produção da fosfolipase e a produção de protease. Esse teste de virulência “in vitro” foi feito também nas cepas isoladas dos locais de captura, com o intuito de se fazer um comparativo das cepas isoladas de fezes de pombos e das cepas isoladas dos insetos.

4.7.1- PRODUÇÃO DE FOSFOLIPASE

4.7.1.1- CEPAS ORIUNDAS DAS FEZES

Todas as cepas de *C. neoformans* isoladas de fezes de pombos dos locais de coleta apresentaram produção de fosfolipase, diferindo apenas os valores de Pz, como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5: Resultado dos testes de produção de fosfolipase, pelas cepas de *C. neoformans* isoladas de fezes de pombos.

| Amostra | Dc (cm) | Dcp (cm) | Pz | Classificação |
|----------|---------|----------|------|---------------|
| CIEP I | 1 | 1,5 | 0,67 | 2 |
| CIEP II | 0,8 | 1,3 | 0,62 | 3 |
| Hospital | 0,9 | 1,5 | 0,6 | 3 |
| Igreja | 0,8 | 1,5 | 0,53 | 3 |

Fonte: Dados Primários

A cepa isolada do CIEP I apresentou Pz compatível com a classificação positiva. Já as cepas isoladas das demais localidades apresentaram Pz compatíveis com a classificação fortemente positiva.

4.7.1.2- CEPAS ORIUNDAS DE BARATAS

Todas as cepas de *C. neoformans* isoladas das baratas coletadas apresentaram produção de fosfolipase, diferindo os valores de Pz, como podemos ver na tabela 6.

Tabela 6: Resultado dos testes de produção de fosfolipase, pelas cepas de *C. neoformans* isoladas de baratas.

| Amostra | Dc (cm) | Dcp (cm) | Pz | Classificação |
|-------------------|---------|----------|------|---------------|
| III – 2 / CIEP I | 1,3 | 1,6 | 0,81 | 2 |
| IV – 2 / CIEP I | 1,1 | 1,5 | 0,73 | 2 |
| II – 4 / CIEP I | 0,8 | 1,4 | 0,57 | 3 |
| V – 6 / Igreja | 0,6 | 1,2 | 0,5 | 3 |
| VI – 10 / CIEP II | 0,7 | 1,5 | 0,46 | 3 |

Fonte: Dados Primários

Duas das cinco cepas (III – 2, IV – 2) apresentaram Pz compatível com a classificação positiva, enquanto as outras três cepas apresentaram Pz compatível com a classificação fortemente positiva.

Segundo Casadevall e Perfect (1998) uma maior produção de fosfolipase pode favorecer a invasão de diversos tecidos, chamando a atenção principalmente para pulmão e cérebro. A secreção de fosfolipase é necessária para a iniciação da infecção pulmonar já que facilita a adesão ao epitélio local e disseminação do agente para os diversos tecidos por via hematogênica e linfática (Ganendren et al., 2006).

Comparando-se a virulência das cepas isoladas das fezes de pombos, com as cepas isoladas das amostras de insetos recolhidos do mesmo local, pode-se observar que a classificação da produção de fosfolipase dessas cepas coincide, isto é, a classificação da cepa de local de coleta foi em 80% das vezes a mesma das cepas isoladas das baratas de acordo com sua origem. Só observamos divergência no caso da cepa II – 4, que tem origem do CIEP I, que apresenta-se classificada como fortemente positiva. Isto permitiu supor que a passagem da levedura pela barata, pode vir a aumentar a virulência da mesma. Para confirmar, é evidente, há a necessidade de testes com um número grande de cepas, e a realização de testes moleculares visando verificar se as cepas isoladas de baratas são as

mesmas isoladas de excrementos. Essa observação reafirma a necessidade de se detalhar em trabalhos futuros se a barata se comporta como vetor mecânico ou biológico para *C. neoformans*.

4.7.2- PRODUÇÃO DE PROTEASE

4.7.2.1- CEPAS ORIUNDAS DAS FEZES

Todas as cepas de *C. neoformans* isoladas de fezes de pombos dos locais de coleta apresentaram produção de protease, diferindo os valores de Pz, como demonstrado na tabela 7.

Tabela 7: Resultado dos testes de produção de protease, pelas cepas de *C. neoformans* isoladas de fezes de pombos.

| Amostra | Dc (cm) | Dcp (cm) | Pz | Classificação |
|----------|---------|----------|------|---------------|
| CIEP I | 0,6 | 1,5 | 0,4 | 3 |
| CIEP II | 0,5 | 1,5 | 0,33 | 3 |
| Hospital | 0,6 | 1 | 0,6 | 3 |
| Igreja | 0,5 | 0,8 | 0,63 | 3 |

Fonte: Dados Primários

Mesmo entendendo que os testes de virulência funcionam em conjunto, havendo muitas vezes a necessidade de atuação de vários deles, para que haja a promoção do processo infeccioso, deve-se considerar que todas as cepas isoladas apresentaram Pz

compatível com a classificação fortemente positiva. Tal fato sugere que essas cepas sejam bem patogênicas a homens e animais.

4.7.2.2- CEPAS ORIUNDAS DE BARATAS

Todas as cepas de *C. neoformans* isoladas das baratas coletadas apresentaram produção de protease, diferindo os valores de Pz, como podemos ver na tabela 8.

Tabela 8: Resultado dos testes de produção de protease, pelas cepas de *C. neoformans* isoladas de baratas.

| Amostra | Dc (cm) | Dcp (cm) | Pz | Classificação |
|-------------------|---------|----------|------|---------------|
| III – 2 / CIEP I | 0,8 | 1,4 | 0,57 | 3 |
| IV – 2 / CIEP I | 0,6 | 1,3 | 0,46 | 3 |
| II – 4 / CIEP I | 0,6 | 1,1 | 0,55 | 3 |
| V – 6 / Igreja | 0,5 | 1 | 0,5 | 3 |
| VI – 10 / CIEP II | 0,5 | 1,4 | 0,35 | 3 |

Fonte: Dados Primários

Todas as cepas isoladas apresentaram Pz compatível com a classificação fortemente positiva.

Segundo Casadevall e Perfect (1998) a capacidade de produzir protease habilita o *C. neoformans* na degradação de tecido do hospedeiro e na destruição de proteínas importantes no sistema imunológico.

Os percentuais de cepas positivas para a produção de protease e fosfolipase a respeito do número de isolados assemelha-se aos verificados por outros autores. Neste trabalho verificamos 100% das amostras positivas para produção de protease e fosfolipase (com variação no Pz), enquanto Rezende (2002) trabalhando com um número de

isolamentos próximo ao nosso (amostras de fezes de pombos e canários) verificou respectivamente 40% e 83,3% destas amostras. A produção de fosfolipase foi de 80% e 50% respectivamente. Pereira (2006) trabalhando com um número bem maior de amostras (57), oriundas de fezes de várias aves, verificou 100% de isolamentos positivos tanto para protease como para fosfolipase.

É certo que as baratas das quais consegue-se isolar *C. neoformans* adquiriram o agente de uma fonte ambiental. Não é seguro afirmar, no entanto, que esta fonte seja o local de onde estes insetos foram recolhidos, embora haja uma grande possibilidade se considerarmos esta possibilidade, quando comparamos os valores dos fatores de virulência analisados, das cepas isoladas dos locais de coleta com as cepas isoladas dos insetos, constatamos que tais valores coincidem com uma lógica. Uma vez que as cepas dos locais são classificadas como fortemente positivas, neste caso, espera-se que as cepas isoladas dos insetos capturados nesses locais sejam também classificadas como fortemente positivas.

Observou-se que cada uma das cepas pode apresentar potencial distinto ao atuar sobre proteínas e fosfolipídios, uma vez que as variações de Pz foram de 0,46 a 0,81 para a produção de fosfolipase entre as nove cepas trabalhadas, e 0,33 a 0,63 para a produção de protease.

Com os dados apresentados, pode-se perceber que células de *Cryptococcus neoformans*, presentes nesses ambientes, e também veiculadas por esses insetos, expressam forte atividade enzimática e, conseqüentemente oferecem um risco potencial às pessoas, principalmente à populações imunossuprimidas, que entram em contato com o agente nesses locais.

Um aspecto que deve ser considerado como pertinente para futuros estudos é o fato de cepas ambientes terem exacerbadas as características de virulência. Silva (2002)

verificou que cepas de *C. neoformans* ambientais e negativas para produção de protease revelaram-se produtoras após inoculação em camundongos BALB/c isogênicos. Steenbergen et al (2001) considerando os mecanismos pelos quais fungos ambientais adquirem e mantem virulência para hospedeiros mamíferos é desconhecido, lançaram a hipótese de que as estratégias de sobrevivência para *C. neoformans* após ingestão pelos macrófagos e pelas amebas são similares, pois ensaios de fagocitose revelaram que *C. neoformans* fagocitado e multiplicados em *Acanthamoeba castellanii* leva à morte das amebas, mas que mutantes para fosfolipase possuem diminuição nos níveis de replicação. Os autores acham que a virulência é consequência de adaptações que se devem a proteção contra predadores ambientais como as amebas. Neste ponto, gostaríamos de considerar que as baratas por serem onívoras, alimentando-se dos mais diversos materiais, ao ingerirem células de *C. neoformans* podem fazer com que estas células sejam fortalecidas em sua virulência. Temos que considerar este fato como uma hipótese somente, mas que faz jus a futuros estudos. Complementarmente a isto, caberia estudar os mecanismos.

5- CONCLUSÕES

5.1- As baratas da espécie *Periplaneta americana* possuem potencial como vetor de *Cryptococcus neoformans* para o ambiente interno de edificações públicas.

5.2- As edificações públicas, devido ao grande número e diversidade de pessoas que as freqüentam, são um risco potencial para a saúde dos visitantes, principalmente os possuidores de algum agravo imunocomprometedor.

5.3- As técnicas de processamento utilizadas podem ser empregadas em outros ensaios semelhantes com insetos.

5.4- Todas as cepas isoladas das baratas apresentam algum grau de virulência se considerarmos a capacidade de produção de protease e fosfolipase.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGG, M.A. **Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* a partir de potenciais reservatórios ambientais inexplorados no Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, UFRGS 2003.** 82p. (Dissertação Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia).

ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathol**, v.161, n.2, p.83-91, 2006.

AOKI, F. H.; IMAI, T.; TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, N. F.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A. Z.; BRANCHINI, M. L. M. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of Random Amplified Polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.2, p.315-20, 1999.

APPEL, A.G. e RUST, M.K. Outdoor activity and distribution of the smokybrown cockroach, *Periplaneta fuliginosa* (Dictyoptera: Blattidae). **Environ. Ent.**, v.14, p.669-673, 1985.

BARONI, F. de A. ; PEREIRA, J. R. ; CAMPOS, F. L. ; DELEITO, C. S. ; SCHERER, R. R. ; CAMPOS, S.G. ; DIREITO, G. M. Presença de *Cryptococcus neoformans* em excretas

de pombos localizadas em torre de igreja da cidade de Manaus – AM. Anais do XXXI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, São Luiz – MA, 2004.

BARONI, F. A.; PAULA, C. R.; SILVA, E. G.; VIANI, F. C.; RIVERA, I. N. G.; OLIVEIRA, M. T. B. e GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v.78, n.2, p.71-75, 2006.

BAVA, A. J.; NEGRONI, R.; BIANCHI, M. Cryptococcosis produced by a uréase negative strain of *Cryptococcus neoformans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v31: 87-89; 1993

BEHEREGARAY, W. K.; POPPL, A. G.; HARTFELDER, C. C.; LANDELL, M.; VELENTE, P.; OLIVEIRA, I.; FERREIRO, L.; OLIVEIRA, R. T.; MACHADO, M. PIGGATO, J. T.; FERREIRA, R. R. & MELLO, F. P. S. Cryptococose em um cão com envolvimento de linfonodos, pele, olhos e glândula mandibular. **Rev. Univ. Rural.** v.25, p.252-3; 2005.

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

BOEKHOUT, T.; THEELAN, B.; DIAS, M.; FELL, J.W.; HOP, W.C.J.; ABELN, E.C.A.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol.**, v.147, p.891-907, 2001.

BRANDT, M.E.; HUTWAGNER, L.C.; KLUG, L.A.; BAUGHMAN, W.S.; RIMLAND, D.; GRAVISS, E.A.; HAMILL, R.J.; THOMAS, C.; PAPPAS, P.G.; REINGOLD, A.L.; PINNER, R.W. Molecular subtype distribution of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, n.4, p.912-7, 1996.

BUCHANAN, K. L. e MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen ? **Emerging Infectious Diseases**. v.5, n.1, 1998.

CALVO, B.; FISCHMAN, O.; CASTELO FILHO, A.; REIS FILHO, J.; DEL BIANCO, R.; BARBOSA, R.M.; ZAROR, L. Detección de antígeno del polisacarido capsular de *Cryptococcus neoformans* em pacientes com SIDA y neurocriptococosis em São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.33, n.6, p.485-90, 1991.

CALVO, B.M.; COLOMBO, A.L.; FISCHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZERA, M.S.; TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYIAJY, M.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p.2348-50, 2001.

CAMPOS, F. L. **Biotipagem, sorogrupagem, produção de protease e fosfolipase por *Cryptococcus neoformans* isolados de cães e gatos nos Municípios de Rio de Janeiro e São Paulo-SP.** Seropédica: UFRRJ, 2006.45p.(Dissertação, Mestrado em Microbiologia Veterinária).

CARVALHO, V.G.; TERCETI, M.S.; DIAS, A.L.; PAULA, C.R.; LYON, J.P.; SIQUEIRA, A.M.; FRANCO, M.C.; Serotype and mating type characterization of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR.; **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**. v49 n4: 207-210, 2007.

CASADEVALL, A. e PERFECT. J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press, 1998, 541p.

CASALI, A.K.; STAATS, C.C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares e epidemiológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.20, p.34-37, 2001.

CASALI, A.K.; GOULART, L.; ROSA E SILVA, L.K.; RIBEIRO, A.M.; AMARAL, A.A.; ALVES, S.H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M.H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, v.3, p.405-415, 2003.

CASTRO, G.; CERVI, M. C. e MARTINEZ, R.; Vertical transmission of *Cryptococcus neoformans* from a mother coinfecting with human immunodeficiency virus: case report. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, n.5, p.501-503; 2006.

CHANDNA, V. K.; MORRIS, E.; GLIATTO, J. M. & PARADIS, M. R. Localised Subcutaneous cryptococcal granuloma in a horse. **Equine Veterinary Journal**, 1993.

CHATURVEDI, V.; WONG, B. E. NEWMAN, S. L.; Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. **The Journal of Immunology**. 156; 3836 – 3840, 1996.

CHEN, L. C. WRIGHT, L. C.; SANTAELO, R.T.; MULLER, M.; MORAN, V.R.; KUCHEL, P. W. e SORREL, T. C. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v.65, p.405-11, 1997.

CHINCHILLA, M. e RUIZ, A. Cockroaches as possible transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. **J. Parasit.**, v.62, p.140-142, 1976.

CONNOLLY, J.H.; KROCKENBERGER, M.; MALIK, R.; CANFIELD, P.J.; WIGNEY, D.I.; MUIR, D.B. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of the koala (*Phascolarctos cinereus*). **Med. Mycol.**, v.37, p.331-8, 1999.

CORRÊA, M.P.S.C.; OLIVEIRA, E.C.; DUARTE, R.R.B.S.; PARDAL, P.P.O.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Criptococose em crianças no estado do Pará, Brasil. **Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop.**, v.32, n.5, 505-8, 1999.

COSTA, E. O.; GANDRA, C. R. P.; PIRES, M. F.; COUTINHO, S.D.; CASTILHO, W. e TEIXEIRA, C. M. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathol.** v.124, p.13-17, 1993.

COSTA, S.; LAZÉRA, M.; MACEDO, R.; BARBOSA, G.; MORALES, B.; BEZERRA, C.; SANTOS, W.; NASCIMENTO, J.; WANKE, B.; Ocorrência de *C. neoformans* em tatuzinhos (Arthropoda, *Armadillium vulgare*, Latreille) coletados em peridomicílio na região metropolitana de Belém, Pará.; In: **V Congresso Brasileiro de Micologia, Anais**. Recife, PE; 376p., 2007.

CRISEO, G.; BOLIGNANO, M.S. ; DE LEO, F. e STAIB, F. Evidence of Canary Droppings as na Important Reservoir of *Cryptococcus neoformans*. **Zeutrabl. Bakteriolog.**, v.282, p.244-254, 1995.

DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop.**, v.33, n.1, p.21-26, 2000.

DELGADO, A.C.N.; TAGUCHI, H.; MIKAMI, Y.; MYIAJY, M.; VILLARES, M.C.B.; MORETTI, M.L. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. **Mycopathol.**, v.159, p.7-11, 2005.

DOLANTE, M.; Factores de virulencia e inmunidad en criptococosis; **Rev. Soc. Ven. Microbiol.** v.21, n.2 ; 2001

DORA, J. M.; KELBERT, S.; DEUTSCHENDORF, C.; CUNHA, V. S.; AQUINO, V. R.; SANTOS, R. P. DOS E GOLDANI, L. Z.; Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus*

gattii in immunocompetent hosts: Case report and review; **Mycopathol.**, v.161: p.235–238. 2006.

DROMER, F.; MATHOULIN, S.; DUPONT, L; LETENNEUR, L.; RONIN, O. and the French Cryptococcosis study group. Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. **Clin. Infect. Dis.**, v.23, p.91-96, 1996.

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

EGRES, C.; POLESE, M.; VAINSTEIN, M.; Isolamento e identificação de leveduras do complexo *Cryptococcus neoformans* de fonte ambiental em serviço de saúde de Porto Alegre.; In: **V Congresso Brasileiro de Micologia, Anais**. Recife, PE; 376p., 2007.

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

ELLIS, D. H. e HOWARD, D.H. Virulence serotype and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. **Infec. Immun.**, v.60, p.1869-1874, 1992.

ERGIN, Ç.; ILKIT, M.; HILMLOGLU, S.; KALELI, I.; GULBABA, A.G.; DERMIRCI, M.; KAYA, S. The first isolation of *Cryptococcus neoformans* from *Eucalyptus* trees in

South Aegean and Mediterranean Regions of Anotolia in Turkey despite Taurus Mountains alkalinity. **Mycopathol.** v. 158, p. 43-47, 2004.

ESTEVEES, J. A.; CABRITA, J. D.; NOBRE, G. N. **Micologia Médica.** Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa- Portugal, 1977, 785p.

FERNANDES, O. de F. L.; COSTA, T. R. ; COSTA , M. R. ; SOARES, A. J. . ; PEREIRA, A. J. S. C. e SILVA , M. R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. **Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop.**;v.33, p.75-78 , 2000.

FERNANDES, O.F.L.; PASSOS, X.S.; SOUZA, L.K.H.; MIRANDA, A.T.B.; CERQUEIRA, C.H.P.V.; SILVA, M.R.R. In vitro susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.6, p.839-41, 2003.

FIGUEIREDO, L. R.; Biocontaminação ambiental e humana por baratas domésticas.; **Vetores & Pragas**; v.3: p.4-6; 1998

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

FLATLAND, B.; GREENE, R.T.; LAPPIN, M.R. Clinical and serologic of cats with cryptococcosis. **J. Am. Vet. Assoc.**, v.209, n.6, p.1110-3, 1996.

FONSECA, F. L. ; BARBOSA, F. M.; ALVIANO, C.; NIMRICHTER, L. e RODRIGUES, M. L. Adhesion of *Cryptococcus neoformans* to human alveolar cells is influenced by its capsular polysaccharide. In: **IV Congresso Brasileiro de Micologia, Anais**. Ouro Preto-MG, 2004. p.94.

FRANZOT, S.P.; HAMDAN, J.S.; CURRIE, B.P.; CASADEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.9, p.2243-51, 1997.

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

FRASER, J.A.; SUBARAN, R.L.; NICHOLS, C.B.; HEITMAN, J. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. **Eukaryotic Cell**, v.2, n.5, p.1036-45, 2003.

GANENDREN, K.; CARTER, E.; SORREL, T.; WIDMER, F. e WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances of *Cryptococcus neoformans* a human lung epithelial cell line. **Microbes and Infection.**; v.20, p.1-10,2006.

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

GROVER, N.; NAWANGE, S. R.; NAIDU, J.; SINGH, S. M.; SHARMA, A.; Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India.; **Mycopathol.**; v.164, p.159–170; 2007.

GUIMARÃES, J.H.; Baratas: manejo integrado em áreas urbanas. **Agroquímica CibaGeigy**; n. 25, 1984.

GUTHRIE, D.M. e TINDALL, A.R. **The biology of cockroach**. Edward Arnold Publ. Ltd. London and Beccles, 408p. 1968.

HARWOOD, R.F. e JAMES, M.T. **Entomology in human and animal health**. Macmillan Publishing Co., Inc., New York, USA, 548p. 1979.

HIBBETT D. S., BINDER M., BISCHOFF J. F., BLACKWELL M., CANNON P. F., ERIKSSON O. E., HUHDORF S., JAMES T., KIRK P. M., LUCKING R., LUMBSCH

H. T., LUTZONI F., MATHENY P. B., MCLAUGHLIN D. J., POWELL M. J., REDHEAD S., SCHOCH C. L., SPATAFORA J. W., STALPERS J. A., VILGALYS R., AIME M. C., APTROOT A., BAUER R., BEGEROW D., BENNY G. L., CASTLEBURY L. A., CROUS P. W., DAI Y., GAMS W., GEISER D. M., GRIFFITH G. W., GUEIDAN C., HAWKSWORTH D. L., HESTMARK G., HOSAKA K., HUMBER R. A., HYDE K. D., IRONSIDE J. E., KOLJALG U., KURTZMAN C. P., LARSSON K., LICHTWARDT R., LONGCORE J., MIADLIKOWSKA J., MILLER A., MONCALVO J., MOZLEY-STANDRIDGE S., OBERWINKLER F., PARMASTO E., REEB V., ROGERS J. D., ROUX C., RYVARDEN L., SAMPAIO J. P., SCHUBLER A., SUGIYAMA J., THORN R. G., TIBELL L., UNTEREINER W. A., WALKER C., WANG Z., WEIR A., WEISS M., WHITE M. M., WINKA K., YAO Y., ZHANG N.; A higher-level phylogenetic classification of the Fungi; **Mycol. Research III**; p. 509–547, 2007

HORTA, J.A.; STAATS, C.C.; CASALI, A.K.; RIBEIRO, A.M.; SCHRANK, I.S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **Med. Mycol.**, v.40, n.6, p.565-71, 2002.

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

HUFFNAGLE, G. B.; STRIETER, R. M.; NCNEIL, L. S.; MC DONALD, R. A.; BURDICK, M. D. E TOEWS, G. B.; The role of TNF and melanin in modulating the development of protective T cell mediated immunity in the lungs to *Cryptococcus*

neoformans. Proceedings of 3rd International Conference on *Cryptococcus* and **Cryptococcosis**. 164, 1996.

IGREJA, R.P.; LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; GALHARDO, M.C.G.; KIDD, S.E.; MEYER, W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city, Rio de Janeiro. **Med. Mycol.**, n.42, p.229-38, 2004.

JUNGERMAN, P.F.; SCHWARTZMAN, R.M. **Veterinary Medical Mycology**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1972. 200 p.

KERL, M.E. Update on canine and feline fungal diseases. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.33, p.721-747, 2003.

KOBAYASHI, C.C.B.A.; HASIMOTO E SOUZA, L.K.; FERNANDES, O.F.L.; BRITO, S.C.A.; SILVA, A.C.; SOUSA, E.D.; SILVA, M.R.R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.47, n.4, p.203-207, 2005.

KURTZMAN, C. P. e FELL, J.W. **The yeast : a taxonomic study**, 4ed., New York, 1998. 1055 p.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; E THEODORE, I. S.; *Cryptococcus bacillisporus* sp. nov, serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*.; **Int. J. System. Bact.**; v.28: p.616- 620, 1978.

KWON-CHUNG, K.J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J.E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). **J. Clin. Microbiol.**, v.15, n.3, p.535-7, 1982.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J.E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Am. J. Epidemiol.**, v.120, n.1, p.123-30, 1984.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea e Figiber, 1992. 866p.

KWON-CHUNG, K.J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J.W.; DIAZ, M. (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v.51, p.804-6, 2002.

LACAZ, C. da S. e RODRIGUES, M.C. - Sorotipagem de *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Bras. Med.**, v.40; p.297-300, 1983.

LACAZ, C. da S.; PORTO, E. e MARTINS, J.C. - **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8. ed. São Paulo, SARVIER, 1991

LACAZ, C.S.; HEINS-VACCARI, E.M.; HERNÁNDEZ-ARRIAGADA, G.L. et al. Primary cutaneous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B, in an immunocompetent patient. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.44 n.4: p.225-228, 2002.

LARSSON, C.E. Criptococose felina: aspectos clínico-epidemiológicos. In: **Simpósio brasileiro de micologia sobre micoses animais**, 1., 2000, Porto Alegre. Resumos. Porto Alegre: Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, 2000; 72p.

LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.31, p.449-54, 1993.

LAZÉRA, M.S.; PIRES, F.D.A.; CAMILLO-COURA, L.; NISHIKAWA, M.M.; BEZERRA, C.C.F.; TRILLES, L.; WANKE, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.34, p.127-31, 1996.

LAZÉRA, M.S.; CAVALCANTI, M.A.S.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* – evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Med. Mycol.**, v.36, p.119-22, 1998.

LAZÉRA, M.S.; SALMITO CAVALCANTI, M.A.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycol.**, v.38, p.379-83, 2000.

LAVELY, J. e LIPSITZ, D. Fungal infections of the central nervous system in the dog and the cat. **Clin. Tech Small Anim Pract.** v.20,n.4,p.212-9,2005.

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

LENGELER, K.B.; COX, G.M.; HEITMAN, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. **Infect. Immun.**, v.69, p.115-22, 2001.

LITVINTSEVA, A.P.; KESTENBAUM, L.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T.G. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.2, p.556-64, 2005.

LOPES, J.O.; COSTA, J.M.; STREHER, L.A.; CLOCK, C.; PINTO, M.S.; ALVES, S.H. Criptococose não associada à AIDS no Rio Grande do Sul: relato de oito casos e revisão da literatura sul-riograndense. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, v.30, n.5, p.369-372, 1997.

MACÊDO, J. T. S. A.; GUEDES, K. M. R.; SANTOS, J. C. A.; NOBRE, V. .M .T.; DANTAS, A. F. M. e RIET-CORREA, F. Criptococose cerebral em bovino na Paraíba. **Arq. Brás. Vet. Zôo.**; v.57,n.1,p. 51, 2005.

MACHADO, C.C.; AMARAL, A.A.; SEVERO, L.C. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.35, n.1, p.77-79, 1993.

MALDONADO, L. B.; SOSA, B. A.; MIZRACHI, R.; Aislamiento de levaduras del género *Cryptococcus* de excretas de palomas.; **Rev. Soc. Ven. Microbiol.** v.21 n.2, 2001

MALIK, R.; DILL-MACKY, E. MARTIN, P.; WIGNEY, D.I.; MUIRS, D.B.; LOVE, D.N. Cryptococcosis in dogs: a retrospective study of 20 consecutive cases. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.33, p.291-297, 1995.

MALIK, R.; WIGNEY, D.I.; MUIR, D.B.; LOVE, D.N. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.35, p.27-31, 1997.

MALIK, R.; KROCKENBERGER, M.B.; CROSS, G.; DONELEY, R.; MADILL, D.N.; BLACK, D.; MCWHIRTER, P.; ROZENWAX, A.; ROSE, K.; ALLEY, M.; FORSHAW, D.; RUSSEL-BROWN, I.; JOHNSTONE, A.C.; MARTIN, P.; O'BRIEN, C.R.; LOVE, D.N. Avian cryptococcosis. **Med. Mycol.**, v.41, p.115-24, 2003.

MELO, N. T. DE; LACAZ, C. DA S.; CHARBEL, C. E.; PEREIRA, A. D.; HEINS-VACCARI, E. M.; FRANÇA-NETTO, A. S.; MACHADO, L. DOS R. E LIVRAMENTO, J. A.; Quimiotipagem do *Cryptococcus neoformans*. Revisão da literatura. Novos dados epidemiológicos sobre a criptococose. Nossa experiência com o emprego do meio de

C.G.B. no estudo daquela levedura. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.35, n.5, 469-478, 1993.

MEYER, W.; MARSZEWSKA, K.; AMIRMOSTOFIAN, M.; IGREJA, R.P.; HARDTKE, C.; METHLING, K.; VIVIANI, M.A.; CHINDAMPORN, A; SUKROONGREUNG, S.; JOHN, M.A.; ELLIS, D.H.; SORRELL, T.C. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA – a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v.20, p.1790-1799, 1999.

MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Disease**, v.9, n.2, p.189-195, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do programa nacional de DTS/AIDS. Brasília, 2002. Disponível em: <www.aids.gov.br> Acesso em: 20 fev. 2007.

MITCHELL, T.G.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Reviews**, v.8, n.4, p. 515-48, 1995.

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

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

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

NIGRO, N.T.M.R.C.; PEREIRA, A.D.; HUGGINS, D.W.; LACAZ, C.S. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos, do solo e ninhos de pombos. **Rev. Bras. Med.**, v.44, n.1 e 2, p.6-9, 1987.

NISHIKAWA, M.M.; LAZÉRA, M.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.L.; BEZERRA, C.C.F.; PÉREZ, M.A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolated from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.1, p.73-7, 2003.

OHKUSU, M.; TANGONAN, N.; TAKEO, K.; KISHIDA, E.; OHKUBO, M.; AOKI, S.; NAKAMURA, K.; FUJII, T.; SIQUEIRA, I.C.; MACIEL, E.A.P.; SAKABE, S.; ALMEIDA, G.M.D.; HEINS-VACCARI, E.M.; LACAZ, C.S. Serotype, mating type and

ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.44, n.6, p.299-302, 2002.

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

PAPPALARDO, M.C.S.M.; MELHEM, M.S.C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.45, n.6, p.299-305, 2003.

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

PASSONI, L.F.C.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M.; 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. **Med. Mycol.**, v.36, p.305-311, 1998.

PASSONI, L. F. C. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. **Rev. Iber. Micol.**, v.16,p.77-81, 1999.

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

PÉREZ, C.; HERNÁNDEZ, Y.; COLELLA, M.T.; ROSELLÓ, A.; HARTUNG DE CAPRILES, C.; OLAIZOLA, C.; MAGALDI, S.; MATA-ESSAYAG, S.; Identificación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* mediante el uso del medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB).; **Rev. Soc. Ven. Microbiol.** v.23 n.2; 2003.

PÉREZ, J.R. La cucaracha como vector de agentes patógenos. **Bol. of Saint Panam.**, v.107, n. 1, p. 41-53, 1989.

POLACHEK, I . e KWON - CHUNG, K. J. Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillisporus*. **J. Bacteriol.** v.142, p. 15 – 20 , 1980 .

PONCE, G., CANTÚ, P. C., FLORES, A., BADI, M., BARRAGÁN, A., ZAPATA, R. E FERNÁNDEZ, I. Cucarachas: biología e importancia en salud pública. **Rev. Salud Publica y Nutrición.** v.6 n.3, 2005.

PRADO, M.A., F. C. PIMENTA, M. HAYASHID, P. R. SOUZA, M. S. PEREIRA E ELUCIR GIR. Enterobactérias isoladas de baratas (*Periplaneta americana*) capturadas em um hospital brasileiro.; **Rev. Panam. Salud Publica;** v.11(2): p.93-97, 2002

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**. v.20, p.7-14, 1982.

RASO, T.F.; WERTHER, K.; MIRANDA, E.T.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. **Med. Mycol.**, v.42, p.355-362, 2004.

REIMÃO, J.Q.; DRUMMOND, E.D.; TERCETI, M. DE S.; LYON, J.P.; FRANCO, M.C.; SIQUEIRA, A. M.; Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brazil.; **Mycoses.**; v.50 n.4: p.261-264; 2007.

REZENDE, D. G. **Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos e canários no município de Alfenas- MG**. Alfenas: Efoa, 2002. 94p.(Dissertação, Mestrado em Ciências Biológicas).

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

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

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

ROZEMBAUM, R.; RIOS, A.J.; WANKE, B.; VIEIRA, W.; *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in a Brazilian AIDS patient. **Mycopathol.**; v.112: 33-34; 1990.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A.J.R.; WANKE, B.; CAIUBY, M.J.; CLEMENTE, H.; LAZÉRA, M.S.; MONTEIRO, P.C.F.; LONDERO, A.T. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. **Mycopathol.**, v.119, p.133-6, 1992.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A.J. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clin. Infect. Dis.**, v.18, n.3, p.369-80, 1994.

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

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

RUSTAN, M. E.; RUBISTEIN, H. R.; SICILIANO, C. e MASIH, D. T. Possibility of in-hospital infection by *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v.34, p.383-87, 1992.

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

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. e GRIFFIN, C. E. **Dermatologia de Pequenos Animais**. 5º Edição, Ed. Interlivros, Rio de Janeiro, 341p., 1995.

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

SILVA, M.E.; PAULA, L.A. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excremento e ninhos de pombos (*Columba livia*) em Salvador, Bahia (Brasil). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.5, p.9-11, 1963.

SILVA, E. G. **Características fenotípicas e sensibilidade a antifúngicos de cepas de *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* após a inoculação em camundongos BALB/c: comparação com os resultados antes da inoculação**. São Paulo: USP, 2002. 107p.(Dissertação, Mestrado em Microbiologia).

SILVA, L. PAIM, K. SANTOS, C. SILVA-VERGARA, M. PEDROSA, A.; Isolamento de *Cryptococcus* spp. de ambiente peri-hospitalar do hospital escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro Uberaba, MG;. In: **V Congresso Brasileiro de Micologia, Anais**. Recife, PE; p.376, 2007.

SILVA, E. G.; BARONI, F. A.; VIANI, F. C.; RUIZ L. S.; GANDRA, R.F.; AULER, M.E.; DIAS, A. L.; GAMBALE, W. e PAULA, C. R. Virulence profile of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* evaluated by experimental infection in Balb/c mic and correlation with exoenzyme activit. **Med. Microbiol.**; v.55,n.2,p.139-42, 2006.

SILVEIRA, C.; SCHEID, L.; LINARES, C. E. B., NASCENTE, P.; SANTÚRIO, L. M.; MEIRELES, M. & ALVES, S. H. Efeito da melanina sobre a susceptibilidade de *Cryptococcus neoformans* à anfotericina B. In: **IV Congresso Brasileiro de Micologia, Anais.** Ouro Preto-MG, 2004. p.56.

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

SORRELL, T.C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med. Mycol.**, v.39, p. 155-68, 2001.

SORRELL, T.C.; ELLIS, D.H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Iber. Micol.**, v.14, p.42-3, 1997.

SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Infect. Dis.**, v.21, n.1, p.28-34, 1995.

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D.C.). **Zeitschrift fur Hygiene**, v.148. p.446-75, 1962.

STAIB, F.; SEIBOLD, M.; ANTWEILLER, E.; FROHLICH, B.; WEBER, S.; E BLISSE A.; The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control

and epidemiology of *C. neoformans*. Infections in AIDS patients. **Zbl. Bakt. Hyg. A.**; 266: 167-177, 1987.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A. e CASADEVALL, A.; *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Microbiol.**; v.98; n.26; 15245-15250; 2001.

STOKES, J. L. Influence of temperature on the growth and metabolism of yeasts. In: ROSE, A. H. & HARRISON, J. S. The yeasts: Physiology and biochemistry of yeasts. Londres: academic Press .london and New York. 1971. Cap.4.

SWINE-DESGAIN, D. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. **Sabouraudia**, v.13,p.303-08, 1975.

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

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

SWINNE, D. ; KAYEMBE, K. ; NIYIMI, M. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* varietate *neoformans* in Kinshasa, Zaire. **Ann. Soc. Belge Med. Trop.** v.66, p. 57-61, 1986.

TRILLES, L.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; GUARRO, J. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.10, p.4815-7, 2004.

VIANNA, E.E.S., BERNE M.E.A. , CHERNAKI, A.M. , SILVEIRA P. JR., RIBEIRO P.B. Performance reprodutiva de *Periplaneta americana* Linneu, 1758 (Blattodea: Blattidae). **Arquivos Instituto Biológico.** v.67, n.1, 2000

VIANNA, E. E. S. ; BERNE, M. E. A. ; RIBEIRO, P. B. Desenvolvimento e longevidade de *Periplaneta americana* Linneu, 1758 (Blattodea: Blattidae). **Rev. Bras. de Agrociência**, v.7 n. 2, p. 111-115, 2001

VIDOTTO, V. ; SINICCO, A. ; Di FARIA, D. ; CARDAROPOLI, S. ; AOKI, S. e ITO-KUWA, S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathol.** v.136, p.119 – 123 , 1996 .

VIDOTTO , V. ; LEONE , R. ; SINICCO, A . ; ITO-KUWA , S . ; CRISEO, G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bord droppings . **Mycopathol.** v.142, p. 71-76, 1998.

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

7- ANEXOS

Anexo 1 – Solução salina com cloranfenicol

Anexo 2 – Meio Sabouraud dextrose a 4 %

Anexo 3 – Meio contendo dopamina

Anexo 4 – Meio de Christensen

Anexo 5 – Meio CGB

Anexo 6 – Meio para verificar produção de fosfolipase

Anexo 7 – Ficha de identificação de leveduras

Anexo 8 – Meio para protease

Anexo 1- Solução salina com cloranfenicol 200 mg/l

| | |
|----------------|--------|
| NaCl | 9,0 g |
| Cloranfenicol | 200 mg |
| Água destilada | 1,0 L |

Distribuição em frascos de Erlenmeyer e autoclavação a temperatura de 120°C por 20 minutos.

Anexo 2 – Meio Sabouraud dextrose a 4%

| | |
|----------------|--------|
| Peptona | 10,0 g |
| Glicose | 40,0 g |
| Agar-agar | 15,0 g |
| Água destilada | 1,0 L |

Fervura até solubilização dos componentes, distribuição em tubos, arrolamento e autoclavação a 120°C por 20 minutos.

Anexo 3 – Meio contendo dopamina

Para 1,0 Litro de água destilada

| | |
|-------------|--------|
| Dopamina | 0,04 g |
| Asparginina | 1,0 g |
| Creatinina. | 0,3 g |
| Glutamina | 1,0 g |
| Glicina | 1,0 g |

Filtração

Diluição em 10 mL de água destilada, filtração em membrana milipore 0,22 μ

| | |
|---------------------------------|--------|
| KH ₂ PO ₄ | 5,0 g |
| MgSO ₄ | 2,5 g |
| Glicose | 5,0 g |
| Tiamina(Protovit®) | 1 mg |
| Cloranfenicol | 200 mg |
| Ágar-agar | 22 g |

Fundir em banho-maria e autoclavar a 120°C por 15 minutos

Misturar em 900 mL de água destilada, autoclavação (120°C / 20'), resfriamento a 50°C, adição da parte filtrada, homogeneização e distribuição em placas.

Anexo 4- Meio de Christensen

| | |
|---------------------|---------|
| Peptona | 1,0 g |
| Dextrose | 1,0 g |
| Cloreto de sódio | 5,0 g |
| Fosfato dissódico | 1,2 g |
| Fosfato de potássio | 0,8 g |
| Vermelho de fenol | 0,012 g |
| Ágar-ágar | 15,0 g |

Adição de 2,4 g do meio de composição básica em 95 mL de água destilada. Autoclavação a 115°C por 20 minutos. Resfriamento a 50°C. Introdução de 5,0 mL de solução de uréia a 40 %. Homogeneização e distribuição do meio em placas

Anexo 5 – Meio CGB
(canavanina, glicina e azul de bromotimol)

| | |
|------------------------------------|---------|
| L canavanina | 30,0 mg |
| Glicina | 10,0 g |
| Sulfato de magnésio heptahidratado | 1,0 g |
| Tiamina (protovit®) | 1 mg |
| Água destilada | 100 mL |
| pH | 5,6 |

Solução com indicador de pH (solução de azul de bromotimol a 0,4 %)

| | |
|--------------------|-------|
| Azul de bromotimol | 0,4 g |
| NaOH (0,01 N) | 64 mL |
| H ₂ O | 36 mL |

Dissolver o azul de bromotimol em 64 mL de Hidróxido de sódio (0,01N) ,adicionando-se, a seguir, 36 mL de água destilada.

Solução estoque B (ágar base com azul de bromotimol)

Em 880 mL de água destilada, adicionar 20 mL da solução de azul de bromotimol a 4%. Adicionar 20 g de ágar e autoclavar por 15 minutos a 115°C.

Solução de uso

Resfriar a solução B a 55°C. Adicionar 100 mL da solução estoque A a 900 mL da solução ágar base com azul de bromotimol (solução estoque B). Homogeneizar e distribuir o meio de cultura em tubos ou placas.

Anexo 6- Meio para verificar produção de fosfolipase

Preparação de gema de ovo

Gema de ovo _____ 80,0 g

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

Meio ágar fosfolipase

| | |
|------------------------------|---------|
| Ágar Sabouraud dextrose..... | 65,0g |
| NaCl..... | 57,3g |
| CaCl ₂ | 0,55g |
| Água destilada..... | 1000 mL |

Autoclavação a 120°C por 20 minutos, resfriamento a 50°C, adição de gema de ovo, homogeneização e distribuição em placa.

Anexo 7 – Protocolo de identificação de leveduras

PROCOLO DE IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS
Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais
DMIV - UFRRJ

PROCEDÊNCIA : _____ REGISTRO : _____

OBSERVAÇÕES :

1- EXAME DIRETO :

2- CRESCIMENTO EM MEIOS USUAIS :
 CRESCIMENTO EM MEIO COM ÁCIDO GRAXO :

3- MICROCULTIVO E TUBO GERMINATIVO :

PM : BL : AR : TG : CL : OUTROS :

4- ASCOS E ASCOSPÓROS :
 POSITIVOS :

5- OUTRAS PROVAS :
 SÍNTESE DO AMIDO :
 PRODUÇÃO DE MELANINA :
 TTC :

6- AUXANOGRAMA

| | | |
|-------------------------|---------------|--------------|
| KNO ₃ | 6- RAFINOSE | 14- XILOSE |
| PEP | 7- TREALOSE | 15-ERITRITOL |
| N-ACETIL -D-GLUCOSAMINA | 8- RAMNOSE | 16-ADONITOL |
| 1-LACTOSE | 9- CELOBIOSE | 17-MANOSE |
| 2- GLICOSE | 10- GALACTOSE | 18- DULCITOL |
| 3- SACAROSE | 11- INULINA | 19-ARABINOSE |
| 4- MELIBIOSE | 12-MELEZITOSE | 20-FRUTOSE |
| 5- MALTOSE | 13- INOSITOL | 21-XILITOL |

7- ZIMOGRAMA

1-RAFINOSE :
 2-GLICOSE :
 3-LACTOSE :
 4-MALTOSE :
 5-SACAROSE :
 6-TREALOSE :
 7-GALACTOSE :

IDENTIFICAÇÃO :

Anexo 8 - Meio para protease (Ruchel et al, 1982)

Solução de estoque (filtrada p/1000mL)

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

Esterilizar por filtração em Millipore (0,22µm)

Solução Base (“Yeast Carbon Base”)

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

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