

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA
CURSO DE MESTRADO EM
MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA**

**A SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIFÚNGICAS DE ISOLADOS
AMBIENTAIS DE *Cryptococcus neoformans*, PROCEDENTES DA
CIDADE DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA,
PARANÁ-BRASIL**

**CURITIBA
2006**

MAURICIO CICHON

**A SUSCETIBILIDADE A DROGAS ANTIFÚNGICAS DE ISOLADOS
AMBIENTAIS DE *Cryptococcus neoformans*, PROCEDENTES DA
CIDADE DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA,
PARANÁ-BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de Concentração Microbiologia, do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho.

**CURITIBA
2006**

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por todo o incentivo e apoio dados durante os momentos difíceis do Curso de Mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná-UFPR e a Coordenação por parte da professora Vanete Soccol.

A Lili, Emilia, Cida técnicas do Laboratório de Micologia da UFPR.

A Professora Rosângela Pinheiro pelas técnicas passadas e apoio sempre oferecido.

A Professora Marisol e Professora Gisele pela atenção e sugestões disponibilizadas.

A Professora Vânia Vicente pelas correções, sugestões e conhecimentos passados.

Ao professor Flávio Queiroz-Telles, pela orientação durante a realização desta dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE ANEXOS	v
LISTA DE APÊNDICES	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 CRIPTOCOCOSE: PATOGÊNESE, ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA	4
3.2 <i>C. neoformans</i> : IDENTIFICAÇÃO E TAXONOMIA	4
3.2.1 Isolamento Ambiental de <i>C. neoformans</i> Variedade <i>neoformans</i> ...	5
3.2.2 Isolamento Ambiental do <i>Cryptococcus gattii</i>	7
3.2.3 Isolamento Ambiental do <i>C. neoformans</i> Variedade <i>grubii</i>	7
3.3 ISOLAMENTO DO <i>C. neoformans</i> DE AVES	8
3.4 TERAPIA ANTIFÚNGICA E TESTES DE SUSCETIBILIDADE	9
4 MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 ÁREA DE ESTUDO	12
4.2 LOCAIS ESCOLHIDOS PARA COLETAS DE AMOSTRA	12
4.3 TIPOS DE AMOSTRAS COLETADAS	12
4.4 COLETA DE AMOSTRAS	13
4.5 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	13
4.6 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS	13
4.7 TESTES DE SUSCETIBILIDADE	14
4.7.1 Meio Sintético	14
4.7.2 Preparo do Inóculo	15
4.7.3 Preparo das Drogas Antifúngicas	15
4.7.4 Tempo de Leitura do Teste	16
5 RESULTADOS e DISCUSSÃO	17
6 CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS	20
ANEXOS	23
APÊNDICES	32

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I

QUADRO 1 - RESULTADO PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE AO FLUCONAZOL	24
QUADRO 2 - RESULTADOS PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE A ANFOTERICINA B.....	24
QUADRO 3 - RESULTADOS PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE AO ITRACONAZOL	25

ANEXO II

FIGURA 1 - MOSTRA ACÚMULO DE FEZES NAS CANALETAS DO SETOR DE MANUTENÇÃO DO H.C, ESTE LOCAL FOI POSITIVO PARA A AMOSTRA 39	26
FIGURA 2 - MOSTRA ESCADA DO PRÉDIO DESATIVADO DO CEASA, ESTE LOCAL FOI POSITIVO PARA ISOLAMENTO DA AMOSTRA 57	26
FIGURA 3 - MOSTRA O PISO DO PRÉDIO INTERDITADO DO CEASA, ESTE LOCAL FOI POSITIVO PARA O ISOLAMENTO DA AMOSTRA 81.....	27
FIGURA 4 - MOSTRA VIGAS DE MADEIRA DO TELHADO DO PRÉDIO DO CEASA, A AMOSTRA DESTE LOCAL FOI POSITIVA PARA O ISOLAMENTO DA AMOSTRA 74	27
FIGURA 5 - MOSTRA ACÚMULO DE FEZES DENTRO DO PRÉDIO INTERDITADO DO CEASA, ESTA AMOSTRA FOI POSITIVA PARA O ISOLAMENTO DA AMOSTRA 73	28
FIGURA 6 - MOSTRA O TELHADO DO ESTACIONAMENTO DO CEASA ONDE SE ENCONTRAM 2 POMBAS MORTAS JUNTO AS FEZES DE POMBO, A AMOSTRA DESTE LOCAL FOI POSITIVA PARA O ISOLAMENTO DA AMOSTRA 80	28
FIGURA 7 - MOSTRA O PRÉDIO INTERDITADO, DESTE LOCAL FORAM COLETADAS DIVERSAS AMOSTRAS DE FEZES DE POMBO QUE FORNECERAM SEIS ISOLADOS DE <i>C. neoformans</i> PARA ESTE TRABALHO.....	29

ANEXO III

TABELA 1 - MOSTRA AS AMOSTRAS POSITIVAS PARA DESENVOLVIMENTO DO <i>C. neoformans</i> ENCONTRADAS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS, INCLUINDO LOCAL E DATA DE COLETA.....	30
TABELA 2 - MOSTRA AS AMOSTRAS POSITIVAS PARA DESENVOLVIMENTO DO <i>C. neoformans</i> ENCONTRADAS NO CEASA, INCLUINDO LOCAL E DATA DE COLETA.....	30

ANEXO IV

QUADRO 1 - COMPARATIVO ENTRE OS RESULTADOS DE CURITIBA E OS UTILIZADOS COMO BASE.....	31
---	----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 -LISTA DAS DROGAS UTILIZADAS E DILUIÇÕES TESTADAS	33
APÊNDICE 2 -AÇÃO DA ANFOTERICINA B SOBRE O <i>C. neoformans</i>	34
APÊNDICE 3 -FORMAÇÃO CORRETA DO ERGOSTEROL.....	34
APÊNDICE 4 -AÇÃO DOS AZÓIS NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO ERGOSTEROL	35
APÊNDICE 5 -BAIRROS DE CURITIBA E TIPO DE AMOSTRAS COLETADAS	36
APÊNDICE 6 -CIDADE DE PINHAIS (REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA)	37
APÊNDICE 7 -MOSTRA OS ESCORES PADRONIZADOS PELA CLSI PARA DETERMINAÇÃO DE POSITIVIDADE OU NEGATIVIDADE NO CRESCIMENTO DO FUNGO NO POÇO	38

LISTA DE ABREVIATURAS

CEASA	- Central Estadual de Abastecimento
CMI	- Concentração Mínima Inibitória
CGB	- Canavanina, glicina e azul de bromotimol
CLSI	- Clinical Laboratory Standart Institute
HC	- Hospital de Clínicas
HIV	- Human Immunodeficient Vírus (vírus da imunodeficiência humana)
K	- Potássio
mL	- mililitro
mm	- milímetro
pH	- Percentual de hidrogênio
R	- Resistente
S	- Sensível
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
μ L	- microlitro
μ m	- micrômetro
μ g/mL	- microgramas por mililitro
\geq	- maior ou igual a

RESUMO

Cryptococcus neoformans trata-se de levedura encapsulada patogênica causadora da criptococose, que em sua forma disseminada alcança as meninges de pacientes imunodeprimidos causando a meningite criptococcica. A identificação de fontes ambientais se faz necessária para minimizar a possibilidade de imunodeprimidos entrarem em contato com o fungo potencialmente patogênico. O isolamento deste fungo é realizado através do processamento de fezes de pombos (*Columba lívia*) e semeadura das mesmas em placa contendo ágar níger (*Guizotia abyssinica*). Testes de sensibilidade frente a diferentes diluições de antifúngicos são necessários para determinar as concentrações mínimas inibitórias (CMI) destas drogas e identificar isolados resistentes aos medicamentos usados no tratamento. Este estudo analisou 88 amostras de diferentes materiais orgânicos (fezes de pombos, materiais vegetais de eucalipto, solo de locais freqüentados por pombos, amostra de fezes de morcegos) destas, 11 amostras foram positivas para o desenvolvimento do *Cryptococcus neoformans* (12,5%). Para as amostras positivas foram realizados testes de sensibilidade aos seguintes antifúngicos: anfotericina B, fluconazol e itraconazol. Nenhum dos isolados foi resistente às drogas utilizadas: as Concentrações Mínimas Inibitórias encontradas foram: CIM de 0.03 a 1 µg/mL para anfotericina B, CIM de 0.125µg/mL para fluconazol e CIM de 0.03µg/mL para itraconazol.

Palavras-chave: *C. neoformans*, pombos, isolamento, antifúngicos.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is a pathogenic encapsulated yeast that causes cryptococose, that in its disseminated form causes the meninges of immunocompromised patients inducing then cryptococic meningitis. The identification of environmental sources to infection is necessary to reduce the possibility of these patients come in contact with the bold. The isolation of this bold, carried through the processing of pigeon feces (*Columba livia*) and inoculation of this feces in plates with niger agar (*Guizotia abyssinica*) that is a seed rich in phenols, that will be oxidized by phenoloxidase, that is an enzyme present in the *C. neoformans*. This study analyzed 88 different samples of organic materials (pigeon feces, materials of eucalyptus and soil), and of those 88, 11 samples were positive to isolation of *C. neoformans*, 12,5%. These had their sensibility tests at different dilutions of antifungic drugs, this is necessary to determine possible resistant isolated to antifungics used in the treatment like anfotericin B, fluconazole e itraconazole. None of the isolated bolds were resistant to the antifungic drugs used. The Minimum Inhibitor Concentration (MIC) found were: to anfotericin B (MIC of 0,03 to 1 µg/mL), to fluconazole (MIC of 0,125µg/mL) e to itraconazole (MIC of 0,03µg/mL). With the results found in the study, we concluded that the city of Curitiba has environmental sources to contamination of *C. neoformans*. The methodology used to isolating is efficient. The ratio of isolation was of 12,5%, and is in conformity with other studies in Brazil as well as in the world. None of the samples were resistant to antifungics tested. These results are in conformity with other studies used with base for this study. The methodology of microtitulation in RPMI 1640 broth tamponed with MOPS of M27-A2 document of CLSI is efficient for MIC determination isolated *C. neoformans*.

Key words: *C. neoformans*, pigeon, isolation, antifungics.

1 INTRODUÇÃO

O fungo recebe o nome de *Cryptococcus neoformans* em sua fase assexuada e *Filobasidiella neoformans* em sua fase sexuada. O *C. neoformans* é um fungo leveduriforme, esférico envolta em espessa cápsula de polissacarídeos que inibem a fagocitose do fungo pelos macrófagos, impedindo a formação de anticorpo, reproduz-se por brotamento, mede entre 5 e 20 µm de diâmetro. Cora-se bem por tinta da China ou tinta nanquim, que devido a sua cápsula não permite a penetração do corante, dando-nos a impressão de um “céu estrelado”, com o fundo negro e as leveduras translucidas.

Cultivado em ágar sangue ou ágar Sabouraud, tanto a temperatura ambiente quanto a 37°C, cresce em uma ou duas semanas sob a forma de colônias de cor creme, planas ou ligeiramente elevadas, brilhantes, úmidas que logo se tornam mucóides e tendem a assumir uma coloração acastanhada, de maneira geral não apresentam micélio. É comumente cultivado em ágar níger (*Guizotia abyssinica*) esta é uma semente usada como alimento por diversas espécies de pássaros, é rica em fenóis, que são oxidados pela fenoloxidase sintetizada pelo fungo, caracterizando as colônias com uma coloração marrom escura, isto dentro de uma semana de cultivo (MAFFEI e SANTOS, 1997; PEREIRA, 2001).

Os antígenos da cápsula determinam cinco tipos de *C. neoformans*: A, B, C, D e AD, sendo este último um híbrido das variedades *neoformans* e *grubii*. Estes sorotipos estão correlacionados com diferentes nichos ecológicos, variedades e com maior ou menor virulência da amostra. O sorotipo A é cosmopolita e o maior causador de criptococose. Os sorotipos A e D são isolados com muita frequência de solo e fezes de aves, principalmente pombos (*Columba lívia*). Os sorotipos B e C raramente são isolados do solo, são causadores da enfermidade em pacientes imunocompetente, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, são normalmente isolados de fragmentos vegetais, em especial eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis*). O *C. neoformans* possui 2 variedades, o *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo A), *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A e D) além de *C. gatti* (sorotipos B e C), antes considerado uma

variedade (RUIZ, VELEZ e FROMTLING, 1989; ELLOT et al., 1995; PEREIRA, 2001; FILIÚ et al., 2002; TAY et al. 2005).

Dentro deste contexto sobre as características ambientais do *C. neoformans*, o presente trabalho tem como objetivos identificar possíveis fontes ambientais para o isolamento do *C. neoformans* na Cidade de Curitiba, e posteriormente testar a suscetibilidade destes isolados frente a diversas diluições de anfotericina B, fluconazol e itraconazol, que são os antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar o *C. neoformans* de amostras ambientais provenientes da Cidade de Curitiba, e testá-los frente aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificação de possíveis fontes ambientais através do isolamento de *C. neoformans*.
- Testar a suscetibilidade de isolados ambientais de *C. neoformans*, frente aos principais antifúngicos disponíveis para o tratamento da criptococose em seres humanos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CRIPTOCOCOSE: PATOGÊNESE, ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

A criptococose é uma micose sistêmica causada por uma levedura encapsulada, o *C. neoformans*, infecta o hospedeiro humano por via inalatória, apresentando tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), este tropismo pode ser explicado de duas formas, a primeira é de que o cérebro é rico em tiamina o que favoreceria o desenvolvimento do fungo esta hipótese foi descartada já que ratos com baixa ingestão de tiamina também desenvolveram a doença, a segunda associa-se ao fato do cérebro ser rico em glutamato de sódio, este constituinte estimularia a síntese da cápsula. Além do acometimento meningoencefálico, responsável por significativos índices de morbidade e mortalidade, *C. neoformans* pode também causar manifestações clínicas: pulmonares, cutâneas, ósteo-articulares, renais, prostáticas e no sistema hematopoiético (LAZERA, WANKE e SHIKAWA, 1993).

Com a utilização de procedimentos imunossupressores como a quimioterapia antineoplásica, corticoterapia e o aparecimento da AIDS, houve um incremento muito grande nos casos descritos de criptococose na literatura. Até 1955 existiam 300 casos descritos de criptococose, sendo que em 1976 nos Estados Unidos foram registrados 338 casos da doença. A criptococose é a quarta infecção que mais causa óbitos em pacientes com AIDS, apenas superada pela tuberculose, pneumocistose e infecções por bactérias comuns.

3.2 *C. neoformans*: IDENTIFICAÇÃO E TAXONOMIA

Em 1990, Ellis e Pfeiffer descobriram na Austrália que havia duas variedades de *C. neoformans* variedade *neoformans* - fungo oportunista, e a variedade *gattii*, patógeno primário; este tem sido mais associado às infecções em pacientes imunologicamente competentes. O *C. neoformans* var. *neoformans* possui os sorotipos A e D. O sorotipo A é mais comumente isolado que o D,

exceto em países como a Dinamarca e Itália, onde o D é mais comum, esta variedade foi isolada de fezes de pombos e de solo contaminado por fezes de outras aves (LAZERA, WANKE e NISHIKAWA, 1993). O *C. neoformans* tem sido tradicionalmente classificado dentro de três variedades, *C. neoformans* variedade *neoformans*, *C. neoformans* variedade *gattii* e *C. neoformans* variedade *grubii*, entretanto, recentes estudos moleculares têm indicado que a variedade *gattii* deve ser reconhecida como uma espécie em separado, tal reconhecimento separa molecularmente baseado no trabalho de BARRETO DE OLIVEIRA et al. (2004), que ao analisar por AFLP (Analyse Fragment Length Polimorphism), revelou a existência de dois principais genótipos, a espécie *C. neoformans* (AFLP genótipos 1 a 3) e *C. gattii* (AFLP genótipos 4 a 6), assim, ficaríamos com *C. neoformans* e *C. gattii*. Ambas as espécies afetam tanto os pulmões quanto o sistema nervoso central, porém, apresentam diferenças quanto à distribuição geográfica, características genóticas, epidemiologia, características clínicas e resposta terapêutica (BARRETO DE OLIVEIRA et al., 2004).

No Brasil, esta variedade já foi isolada a partir de outros substratos, como ocos de árvores, ninho de marimbondos, fezes de morcego entre outros. Propágulos com menos de 2µm de diâmetro, são encontradas em fezes desidratadas de pombos e no solo. Estas dimensões possibilitam ao agente, atravessar toda a árvore respiratória, chegando até os alvéolos, iniciando a infecção.

3.2.1 Isolamento Ambiental de *C. neoformans* Variedade *neoformans*

FILIÚ et al. (2002) comprovaram, pela primeira vez, a contaminação de excretas de aves de cativeiro por *C. neoformans* variedade *neoformans* na Cidade de Campo Grande. Foram observadas concentrações do fungo de até 46.000 propágulos viáveis por grama de material seco, o que é considerado elevado, refletindo a existência de fontes ambientais na forma de microfocos do fungo, possibilitando que estes propágulos sejam inalados, pois também se apresentam dispersos no ar. A contaminação pode estar relacionada ao grande ciclo de aves nas gaiolas, a forma de limpeza das mesmas ou viveiros, utilizando-se da mesma

ferramenta e a grande quantidade de sementes nestes locais que podem servir como substrato para o fungo. Mais recentemente a variedade *neoformans* foi associada à madeira em decomposição, proveniente Isolamento ambiental de *C. neoformans* variedade *neoformans*.

Trabalhos pioneiros de EMMONS, no início dos anos 50, fazem referência ao acúmulo de excretas secas e envelhecidas de pombos (*Columba livia*) em solos contaminados como fontes saprobióticas de *C. neoformans* em ambientes urbanos. Staib em 1984, concluiu que a exposição dos homens e animais a excretas destas aves explica pelo menos em parte a epidemiologia da criptococose (RUBIO et al., 1984; BAWENS et al., 1986; LACAZ et al., 1987; RUIZ, VELEZ e FROMTLING, 1989 ; ELLIS e PFEIFFER, 1990; FILIÚ et al., 2002).

PASSONI et al. (1999), encontraram 15% de positividade na poeira de residências na Cidade do Rio de Janeiro, tal comprovação é valorizada pelo achado do *C. neoformans* variedade *neoformans* nos excretas de aves, como canários, periquitos e outros psitacídeos em cativeiro nestas residências. Foi demonstrando uma correlação entre a existência de aves cativas no ambiente domiciliar e a probabilidade de contaminação destas residências por *C. neoformans* (FILIÚ et al., 2002).

MONTENEGRO e PAULA (2000) comprovaram a ocorrência do *C. neoformans* variedade *neoformans* em fontes ambientais urbanas na Cidade de São Paulo, dos 38 sítios analisados, foram coletadas amostras de fezes de pombos, dez (26,3%) apresentaram positividade para o isolamento do fungo, e ainda duas amostras do fungo foram obtidas de materiais vegetais de eucaliptos provenientes do parque Ibirapuera e da Aclimação (MONTENEGRO e PAULA, 2000).

Os isolamentos obtidos comprovam a necessidade de minimizar a exposição ao *C. neoformans* variedade *neoformans* em locais de circulação pública através da limpeza constante, evitando-se assim o acúmulo de fezes de aves nestes locais e nas residências de pessoas imunocomprometidas (FILIÚ et al., 2002).

3.2.2 Isolamento Ambiental do *Cryptococcus gattii*

C. gattii (sorotipos B e C) é conhecido por sua afinidade com matéria orgânica viva, servindo como fonte de infecção para os humanos. Esta espécie ocorre em regiões tropicais e subtropicais, acometendo hospedeiros imunocompetentes. No Brasil *C. gattii* foi isolado de oco de árvores tropicais, como o oiti (*Moquilea tomentosa*), cássia rosa (*Cassia grandis*), figueira (*Ficus microcarpa*) e outros, evidenciando diferentes habitats naturais para essa variedade, alcançando taxas de 62% no Brasil, tornando-o endêmico nas regiões Norte e Nordeste. Foi inicialmente associado à *E. camaldulensis* na Austrália, seguindo-se seu isolamento de restos vegetais de eucaliptos em diferentes países (ELLIS e PFEIFFER, 1990; FISHER et al., 1993; PADHYE et al., 1993; FILIÚ et al., 2002; PEREIRA, 2001).

Estudos recentes demonstram que tanto *E. camaldulensis* quanto *E. tereticornis* que são exportados da Austrália por via marítima podem albergar o *C. gattii*, isto demonstra bem a distribuição epidemiológica da criptococose causada pelo *C. gattii* (ELLIS e PFEIFFER, 1990; PADHYE et al., 1993; FILIÚ et al., 2002).

Na Cidade de São Paulo um estudo realizado por MONTENEGRO e PAULA (2000) comprovou a associação do *C. neoformans* variedade *gattii* com o eucalipto, já que em um período de dois anos através de coletas mensais, 12 eucaliptos dos parques da cidade foram analisados. Os resultados revelaram que apenas um *E. camaldulensis* apresentou positividade para o fungo, em duas coletas realizadas nas mesmas estações (novembro de 1996 e novembro de 1997) apresentando um evento sazonal (MONTENEGRO e PAULA; 2000).

3.2.3 Isolamento Ambiental do *C. neoformans* Variedade *grubii*

O sorotipo A, atualmente denominado variedade *grubii* é o sorotipo prevalente em amostras ambientais, como, excrementos de pombos, restos de vegetais e ar atmosférico. Tal associação com excretas de pombos é bem conhecida, porém, esta variedade também tem sido isolada de fezes de outras

espécies de aves, principalmente Psitacídeos. A variedade *grubii* está relacionada com a meningite fúngica em pacientes imunocomprometidos em todo o mundo.

As amostras positivas de *C. neoformans* variedade *grubbi*, foram isoladas de amostras de fezes de pombos observadas no estudo de KOBAYASHI et al. (2005), estas foram identificadas em locais fechados sugerindo alta exposição ao fungo. KOBAYASHI et al. em 2005 mostraram que a contaminação por *C. neoformans* variedade *grubii* foi maior em locais protegidos das intempéries ambientais, do que em locais não protegidos. O insucesso no isolamento deste fungo de amostras de fezes de aves provenientes de criadouros é atribuída pelos autores à temperatura baixa no momento da coleta, da umidade e da decomposição por bactérias, causando assim, a alcalinização do substrato, inibindo desta forma o crescimento do *C. neoformans*. O rápido crescimento de fungos filamentosos pode mascarar o desenvolvimento do *C. neoformans* independente da variedade em amostras de fezes de pombos, proporcionando um resultado falso negativo (KOBAYASHI et al., 2005).

3.3 ISOLAMENTO DO *C. neoformans* DE AVES

Alguns trabalhos experimentais documentam que o trato digestório de pombos deve ser colonizado por *C. neoformans* e quando estes são excretados junto com as fezes, continuam viáveis, outros estudos sugerem que a excreta dos pombos poderia enriquecer o solo, fornecendo nutrientes para o desenvolvimento do *C. neoformans* presente neste local, o guano (excretas de morcegos), por exemplo, contém uma mistura de constituintes químicos, incluindo a creatinina, que fornece condições de multiplicação ao microrganismo (MAFFEI e SANTOS, 1997; PEREIRA, 2001; FILIÚ et al., 2002; MALIK et al., 2003).

A alta temperatura corporal dos pombos (40-44°C) é um conhecido inibidor da proliferação do *C. neoformans* tanto “in vitro” quanto “in vivo”. Sendo, portanto a criptococose clínica raramente observada nestas aves (KWONG-CHUNG, VARMA e HOWARD, 1988; MALIK et al., 2003).

MALIK et al. (2003), realizaram um estudo na Austrália utilizando-se de 26 casos de criptococose em aves. Características da ave como: observações

citológicas e histológicas, encontrados micológicos, respostas à terapia antifúngica e dados da necropsia foram coletados. Os casos estudados são insuficientes para se generalizar os episódios envolvidos na criptococose em aves, porém são bem definidas as duas principais portas de entrada pelas quais os propágulos do *C. neoformans* alcançam os tecidos das aves, o trato respiratório e a pele. Em aves imunocompetentes, o envolvimento geralmente é restrito ao trato respiratório superior ou estruturas muito próximas à cavidade nasal, refletindo a melhor capacidade do *C. neoformans* se reproduzir e produzir os fatores de virulência em temperaturas abaixo de 40°C (MALIK et al., 2003).

O *C. neoformans* é considerado um patógeno oportunista quando o microrganismo não está restrito a sítios superficiais frios, mas quando penetra profundamente no trato respiratório inferior ou disseminando, isto é causado pela queda na imunidade do pássaro, as causas da imunodeficiência nestes pássaros configuram-se como diminuição na proteção da microbiota do intestino e do trato respiratório superior, como consequência da ação de longos tratamentos com antibióticos de amplo espectro, causando desequilíbrio na microbiota (FILIÚ et al., 2002; MALIK et al., 2003).

3.4 TERAPIA ANTIFÚNGICA E TESTES DE SUSCETIBILIDADE

A criptococose é tratada com anfotericina B, o fluconazol e o itraconazol aos quais o *C. neoformans* não apresenta resistência. A anfotericina B (fungistático extraído do *Streptomyces nodosus*) tem como alvo a membrana celular dos fungos. Os poliênicos ligam-se ao ergosterol presente na membrana de fungos, formando poros e ou canais, que resultam no aumento da permeabilidade causando um desequilíbrio osmótico, que leva a célula à morte. O (Apêndice 2) Mostra a ação da anfotericina B no desequilíbrio osmótico do *C. neoformans*.

Por outro lado os azóis como, fluconazol e itraconazol são compostos totalmente sintéticos e seu mecanismo de ação consiste na inibição do α -14-dimetilase, um sistema enzimático microssomal dependente da enzima citocromo p450 codificada pelo gene ERG 11, que prejudica a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática, levando ao acúmulo de 14-metilesteróis, estes por não

possuírem as mesmas propriedades físicas que o ergosterol proporcionam formação da membrana com propriedades alteradas, que não desempenham as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo (Apêndice 4) Mostra a ação do itraconazol e fluconazol na inibição e na lise do *C. neoformans*. O Apêndice 3 mostra a formação correta do ergosterol.

Os azóis são considerados tanto fungistáticos como fungicidas e causam menos reações adversas que a anfotericina B, porém, são menos potentes (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004).

Usando o método de microdiluição em caldo padronizado pela CLSI (Clinical Laboratory Standart Institute) e o E-test, BRANDT et al. (2001), demonstraram que a resistência "in vitro" para isolados clínicos de *C. neoformans* é incomum. No estudo realizado por TAY, 2005 uma concentração mínima inibitória (CMI) precisa não foram alcançados para isolados ambientais, assim todos foram sensíveis a anfotericina B, ao fluconazol, e ao itraconazol com CMIs de ≥ 1 , ≥ 8 e $\geq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (BRANDT et al., 2001).

O Subcomitê de Testes de Suscetibilidade Antifúngica do Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade a Antifúngicos (AFST- EUCAST) desenvolveu uma proposta padronizando microtitulação em caldo como procedimento para determinação de CMIs de antifúngicos para algumas espécies de leveduras. Este padrão é determinado pelo documento M27-A2, procedimento referente à microdiluição em caldo do CLSI (Clinical Laboratory Standart Institute) (BRANDT et al., 2001).

Em estudo realizado por CALVO et al., 2001, ao analisar a cem isolados clínicos de *C. neoformans* isolados de pacientes HIV positivos e HIV negativos do Brasil, Chile e Venezuela verificaram suscetibilidade frente a quatro drogas antifúngicas: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-Flucitocina. O método utilizado por CALVO et al. (2001), foi o de microdiluição em caldo RPMI 1640, tamponado com MOPS, este padronizado pela CLSI. O ponto de leitura adotado para determinar a CMI para anfotericina B foi o de inibição de qualquer crescimento (escore zero), para os azóis a menor concentração com decréscimo proeminente do crescimento (escore 2) foi o utilizado. Nenhum dos isolados demonstrou resistência a qualquer um dos antifúngicos. As concentrações mínimas inibitórias (CMI) encontradas foram; para anfotericina B (entre 0,125 e

0,5 $\mu\text{g/mL}$), Fluconazol (entre 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$) e Itraconazol (entre 0,06 e 0,125 $\mu\text{g/mL}$). Tais CMI's se apresentam em conformidade com outros trabalhos que utilizaram as mesmas drogas e o mesmo método (CALVO et al., 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

A Cidade de Curitiba, capital do Estado do Paraná, possui muitos locais com alta concentração de pombos, tanto no centro da cidade como em sua região metropolitana e periferia, tais locais são de acesso público, o que aumenta as chances de pessoas imunocomprometidas entrarem em contato com o *C. neoformans* e desenvolverem a criptococose.

4.2 LOCAIS ESCOLHIDOS PARA COLETAS DE AMOSTRA

Foram escolhidos locais com acúmulo de fezes e com grande população de pombos. O Apêndice 5 mostra a Cidade de Curitiba, evidenciando os locais onde foram coletas as amostras e o Apêndice 6 mostra a Cidade de Pinhais no Mapa da Região Metropolitana de Curitiba, mostrando, também, a Cidade de Pinhais, de onde foram coletadas amostras de fezes de Pombo (ver apêndice).

- a. Hospital de Clínicas da UFPR.
- b. Passeio Público de Curitiba.
- c. Praças de Curitiba (Santos Andrade e Rui Barbosa).
- d. Ceasa de Curitiba, situado no bairro Capão da Imbuía.
- e. Moinho de farinha de trigo Molino Rosso, situado na Cidade de Pinhais.

4.3 TIPOS DE AMOSTRAS COLETADAS

- a. Fezes de aves e morcegos.
- b. Terra e areia com excrementos.
- c. Materiais orgânicos (penas e folhas).
- d. Fragmentos de flores, caules e folhas de eucaliptos.

4.4 COLETA DE AMOSTRAS

Coleta-se aproximadamente 30 gramas de cada amostra, para isso são utilizadas espátulas de madeira descartáveis e coletores plásticos estéreis com capacidade para 100 mL. Após coletar os materiais, estes são processados no laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR. As 88 amostras foram coletas no período de 13 meses (setembro de 2004 a setembro de 2005).

4.5 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Para isolamento, foi empregado o método de STAIB modificado. Aproximadamente dez gramas das amostras foram depositadas em provetas de 250 ML contendo 40 mL de solução fisiológica esterilizada, procede-se a agitação manual por dois minutos, posteriormente o material foi deixado em repouso por dez minutos. Foram pipetados 8 mL do sobrenadante, utilizando-se uma pipeta volumétrica de 10 mL, colocando-os em tubos cônicos de 15 mL com tampa de rosca, juntando-os a 2 mL de solução de antibióticos (água destilada estéril, contendo 4,5 mg/mL de penicilina cristalina e 10 mg/mL de estreptomicina) que foi alíquotada com uma pipeta volumétrica de 5 mL. Após homogeneização, 100 µL da suspensão foram semeados através de esgotamento por quadrantes em três placas de petri contendo ágar níger (*Guizotia abyssinica*), incubando-se a 30°C por até sete dias. As culturas foram examinadas diariamente, identificando-se todas as colônias sugestivas, ou seja: marrons, pequenas e brilhantes que se desenvolveram no ágar níger (SILVA e PAULA, 1963; SWINNE-DESGAIN, 1976; BAWENS et al., 1986; RUIZ, VELEZ e FROMTLING, 1989; ELLIS e PFEIFFER, 1990; MACHADO, AMARAL e SEVERO, 1993; OLIVEIRA et al., 2004; PAL, 1995; QUEIROZ-TELLES et al., 1997; RUBIO et al., 1984).

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS

A identificação dos isolados foi feita por métodos morfológicos e fisiológicos. Dentre os testes morfológicos observou-se macromorfologia e micromorfologia fúngica, sendo esta realizada em objetivas de 10 e 40 x. Com

relação aos testes fisiológicos pesquisou-se a ação da uréase, capacidade de assimilação de carboidratos, além da pesquisa da fenol oxidase feita inicialmente no meio de ágar níger e a termotolerância a 35°C.

Os isolados foram identificados através da realização do teste de Auxanograma (teste de assimilação de carboidratos), onde são colocados em placas de 150 mm X 90 mm, uma solução das colônias suspeitas de *C. neoformans*, suspensas em salina 0,85% esterilizada. Após se adicionar a suspensão são adicionados 15 ml do meio fundido como fonte de Nitrogênio e fonte de Carboidrato conhecidas, em seguida através de movimentos lentos se distribui o meio por toda a placa, após a solidificação do meio foram adicionados os açúcares para o teste em discos ou em pó. A turbidez foi ajustada utilizando-se a escala 0,5 McFarland (PROBAC Brasil), assegurando uma suspensão contendo aproximadamente 1×10^6 a 5×10^6 células por mL, assim a leitura foi realizada com 24 e 48 horas de incubação à 35°C.

Os 11 isolados identificados como *C. neoformans* mostraram o mesmo perfil fisiológico condizente com a literatura, onde estes são positivos para a assimilação de peptona, rafnose, dextrose, sacarose, maltose, dulcitol, trealose, galactose e inositol e não apresentam assimilação de KNO₃, lactose e melobiose.

Na tentativa de se identificar o *C. gatti*, todos os isolados foram semeados em ágar canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB), que é usado com sucesso para isolamento diferencial das espécies. De um a cinco dias, o *C. gattii* torna o meio de CGB, cuja cor original é verde claro, em azul, devido a alterações no pH. As variedades *neoformans* e *grubbi* não produzem tais mudanças (SWINNE-DESGAIN, 1975; LACAZ et al., 1987; ELLIS e PFEIFFER, 1990; MACHADO, AMARAL e SEVERO, 1993; OLIVEIRA et al., 2004).

4.7 TESTES DE SUSCETIBILIDADE

4.7.1 Meio Sintético

O meio de cultura utilizado para os testes de suscetibilidade foi o RPMI 1640 (Sigma). Este meio foi tamponado com MOPS (ácido 3-(N-morfolino)

propanosulfônico) com concentração final de 0,156 mol/Litro em pH 7,0, esterilizado por filtração (usando-se filtro 0,22 µm), sendo utilizado o MOPS por não interferir na atividade dos antifúngicos, e armazenado em geladeira (4°C) até o momento do uso (BRANDT et al., 2001; CALVO et al., 2001; NCCLS, 2002).

4.7.2 Preparo do Inóculo

Os isolados foram mantidos através de subcultivos em ágar batata-dextrose à 35°C até o momento do plaqueamento também em ágar batata dextrose, após 48 horas de incubação aproximadamente cinco colônias foram suspensas em 5 ml de salina estéril (0,85%), e a turbidez foi ajustada utilizando-se a escala 0,5 McFarland (PROBAC Brasil), assegurando uma suspensão contendo aproximadamente 1×10^6 a 5×10^6 células por mL, em seguida cada uma das suspensões foi diluída 1:50 em salina esterilizada e 1:20 em meio RPMI, deixando a suspensão 2X concentrada (1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL), esta suspensão será diluída 1:2 com a suspensão de antifúngicos a ser testado, no momento da inoculação da placa de microtitulação (NCCLS, 2002).

4.7.3 Preparo das Drogas Antifúngicas

Para este teste de suscetibilidade foram utilizadas três drogas antifúngicas: anfotericina B (CRISTÁLIA-Brasil), fluconazol (MERK-4148) e Itraconazol (MERK-5266), sendo que anfotericina B e itraconazol foram dissolvidos em DMSO (Dimetilsufóxido) e fluconazol em água ultrapura (Apêndice 1) Mostra a lista das drogas utilizadas e diluições testadas no teste de sensibilidade (ver apêndices) (NCCLS, 2002).

As diferentes diluições foram adquiridas em concentrações 100 vezes a concentração utilizada. No momento do uso cada concentração de cada antifúngico foi diluído 1:100 em meio RPMI 1640, deixando as suspensões 2x concentradas, e estas foram diluídas 1:2 (proporção 1:1) no momento da inoculação da placa de microtitulação, juntamente com a suspensão de *C. neoformans*, também 2x concentrada (NCCLS, 2002).

Para o teste de microdiluição foram utilizadas placas de microtitulação de fundo chato contendo 96 poços (KARTEL-Itália). Cada poço recebeu 100 µL da suspensão de *C. neoformans* em meio RPMI 2x concentrada, e 100 µL da suspensão do antifúngico também 2x concentrada (NCCLS, 2002; KOBAYASHI et al., 2005).

Para cada diluição de cada uma das drogas, foi deixado um poço contendo apenas o agente antifúngico, este poço foi utilizado para controle negativo do crescimento do fungo no teste, o tubo esterilizado onde se realizou a diluição das amostras de *C. neoformans* em meio RPMI 1640 foi colocado a 35°C como controle positivo do crescimento do fungo, que ocorreu em 48 horas (NCCLS, 2002).

A determinação de concentração mínima inibitória para cada uma das drogas seguiu o critério determinado pela CLSI. Lista de escores padronizados para o método de suscetibilidade (Apêndice 7).

Para anfotericina B, a concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada como a menor concentração onde se observou o escore 0 (oticamente claro).

Para fluconazol e itraconazol, a concentração mínima inibitória (CMI) ficou determinada como a menor concentração que apresentou o escore 2 (redução proeminente do crescimento).

4.7.4 Tempo de Leitura do Teste

Os resultados para testes de microdiluição para concentração mínima inibitória (CMI) são alcançados com leitura de 24 a 48 horas. A leitura realizada com 48 horas é a que apresenta resultados melhores e com breakpoints (ponto de mudança na turvação do meio) visualizados com maior facilidade. (NCCLS, 2002; SOARES et al., 2005).

Segundo SOARES et al., 2005, um isolado de *C. neoformans* somente pode ser considerado resistente a estas drogas testadas se sua concentração mínima inibitória (CMI) for ≥ 2 µg/mL para anfotericina B, se ≥ 16 µg/mL para fluconazol e se ≥ 1 µg/mL para itraconazol.

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Das 88 amostras coletadas, 11 apresentaram positividade para o desenvolvimento do *C. neoformans*, com uma taxa de 12,5% que apresenta-se em conformidade com os estudos tomados como base, como os de KOBAYASHI et al. (2005) que obtiveram 20,9% na Cidade de Goiânia, SOARES et al. (2005) que obtiveram 13,5 % na Cidade de Santos e TAY et al. (2005) na Malásia que obtiveram 3,5%.

No trabalho de TAY et al., os pesquisadores, explicam que devido à dificuldade em encontrarem amostras secas de fezes de pombos a taxa de isolamento ambiental se apresentou baixa em comparação com os outros estudos (TAY et al., 2005) .

Todas as amostras positivas neste estudo foram obtidas de locais com grande concentração de pombos, protegidos das intempéries e sob o abrigo da luz solar, fornecendo amostras de fezes secas e em grande quantidade, que segundo KOBAYASHI et al. (2005) devido à capacidade do *Cryptococcus neoformans* em resistir a ambientes ressecados sobrevive em quanto que outros microrganismos morrem em situações adversas como as encontradas nestas amostras. O anexo II mostra figuras dos locais de onde foram coletadas amostras de fezes de pombos, as quais foram positivas para o desenvolvimento do *C. Neoformans*.

O Hospital de Clínicas de Curitiba apresentou cinco amostras positivas para o desenvolvimento do fungo (Anexo III, Tabela 1) assim como o CEASA que apresentou seis amostras positivas para o desenvolvimento do *C. Neoformans* (Anexo III, Tabela 02).

Nas 77 amostras restantes coletas de locais como as praças Santos Andrade, Rui Barbosa e Portugal (Igreja do Perpétuo Socorro), dos eucaliptos do Centro Politécnico da UFPR, Moinho Molino Rosso na Cidade de Pinhais, uma amostra de fezes de morcego, amostras de areia e terra de galinheiros e solo de locais freqüentados por pombos na Cidade de Curitiba, após análise (descrita em materiais e métodos) não apresentaram resultado positivo para o desenvolvimento do *C. neoformans*, segundo KOBAYASHI et al. (2005) isto

ocorre por que amostras que se apresentam úmidas, criam ambiente favorável ao desenvolvimento de bactérias, que alcalinizam a amostra e inibem o desenvolvimento do *C. Neoformans*. Amostras coletadas no Jockey Club, encontravam-se em lugar coberto e em grande quantidade, porém, estavam úmidas e portanto não apresentaram desenvolvimento do fungo, o que é explicado por KOBAYASHI et al. (2005) relacionando-as com a alcalinização promovida pelas bactérias .

Os 11 isolados foram caracterizados como *C. neoformans*, pois quando semeados em ágar CGB que apenas é positivo para amostras de *C. gattii*, não apresentaram mudança de cor, caracterizando o teste como negativo.

Quanto ao teste de suscetibilidade do *C. neoformans* frente aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol os resultados estão apresentados no Anexo I (Quadros 1, 2 e 3) que mostram CMI encontrada para a anfotericina B entre 0,03 e 0,5 µg / mL, para fluconazol de 0,03 µg / mL e para itraconazol de 0,03 µg / mL, estes resultados segundo SOARES et al. (2005) estão abaixo dos valores considerados como resistentes, assim os isolados ambientais de *C. neoformans* testados neste estudo são sensíveis às drogas usadas. Estes resultados estão em conformidade com os resultados apresentados por TAY et al. (2005), SOARES et al. (2005), KOBAYASHI et al. (2005) e CALVO et al. (2001), que também não encontraram amostras de *C. neoformans* resistentes aos antifúngicos, o que pode ser visto no comparativo entre os estudos apresentado no Anexo IV (Quadro 1).

Se desconsiderarmos a origem ambiental das amostras de *C. neoformans* testadas, e considerarmos estes isolados como potenciais patógenos, os resultados apresentados pelos testes de sensibilidade frente à anfotericina B, fluconazol e itraconazol, concluiríamos que os *C. neoformans* isolados da Cidade de Curitiba seriam de fácil tratamento, já que as CMI alcançadas pelos isolados estão abaixo do que se considera como resistente, sendo desta forma inibido o seu desenvolvimento e reprodução.

6 CONCLUSÃO

- A Cidade de Curitiba apresenta possíveis fontes ambientais para o desenvolvimento do *C. neoformans*.
- Fezes secas, em grande quantidade e protegidas das intempéries, apresentam melhores condições para o isolamento ambiental do *C. neoformans*, isto é explicado por KOBAYASHI et al. (2005) como sendo uma habilidade do fungo em resistir a ambientes ressecado enquanto que outros microrganismos morrem em tais condições. Por outro lado fezes úmidas e desprotegidas, que devido à alcalinização das fezes em decorrência da ação de bactérias propiciam ambiente desfavorável ao desenvolvimento do fungo.
- O método de Staib modificado para isolamento do *C. neoformans* é apresentou-se neste estudo de maneira eficiente no isolamento do *C. neoformans* provenientes de amostras ambientais
- Os isolados de *C. neoformans* obtidos de amostras ambientais na Cidade de Curitiba apresentaram, assim como em outros estudos realizados no Brasil e no mundo, suscetibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol, que são os medicamentos utilizados para o tratamento da criptococose.
- A metodologia recomendada pela CLSI (Clinical laboratory Standart Institute), de microdiluição em meio líquido RPMI 1640, tamponado com MOPS (ácido 3 (N-morfolino) propanosulfônico) apresenta-se como uma metodologia de confiável para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) em isolados de *C. neoformans* em laboratórios de micologia .

REFERÊNCIAS

BARRETO DE OLIVEIRA et al. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **Journal of Microbiology**, v.42, p.1356-1359, 2004.

BAWENS, L.; SWINNE, D.; DE VROEX, C.N.; DE MEURICH, W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* in the aviaries of Antwerp zoological gardens. **Mycoses**, v.29, p.291-294, 1986.

BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS. S. New antifungic drugs: A review. Curitiba-PR, **Visão Acadêmica**, v.5, n.2, p.159-172, dez. 2004.

BRANDT, M.E.; PFALLER, M.A.; HAJJED, R.A.; HAMIL, R.J.; PAPPAS, P.G.; REINGOLD, A.L.; RIMLAND, D.; WARNOK, D.W. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n.11, p. 3065-3069, Nov. 2001.

CALVO, M.B.; COLOMBO, A.L.; FISHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, M.L.; QUEIROZ-TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYUAI, M.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile and Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, p.2348-2350, Jun 2001.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Ecology life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. **The Lancet**, v.336, p.923-925, 1990a.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.8, p.1642-1644, 1990b.

ELLOT, P.; VON HUNNIUS, P.; DE HOOG, G.S; POLAK-WISS, A.; GUÉHO, E.; MASCLAUS, F. Systemic mycosis caused by a new *Cladosporium* species. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.33, p.349-354, 1995.

FISHER, D.; BURROW, J.; LO, D.; CURRIE, B. *Cryptococcus neoformans* in tropical northern Australia predominantly var. *gattii* with good outcomes. **Australia Journal of Medicine**, v.23, p.678-682, 1993.

FILIÚ, W.F.; WANKE, B., AGUENA, S.M.; VILELA, V.O.; MACEDO, R.C.L.; LAZERÁ, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, 2002.

KWONG-CHUNG, K.J.; VARMA, A.K.; HOWARD, D.H. Ecology and epidemiology of study of *Cryptococcus neoformans*: a recent isolate in the United States. **Journal of Microbiology**, v.14, p.107-112, 1988.

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

LACAZ, C.S.; HUGGINS, D.W.; PEREIRA, A.D.; NIGRON, N.T.M.R.C. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de pombos do solo e ninhos de pombos. **Revista Brasileira de Medicina**, v.44, p.6-9, 1987.

LAZERA, M.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.31, p.449-454, 1993.

MACHADO, C.C.; AMARAL, A.A.; SEVERO, L.C. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, p.77-79, 1993.

MAFFEI, C.M.L.; SANTOS, M.R.O.R. Curso de micologia médica. **Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP**, p.111-115, 1997.

MALIK, R.; KROCKENBERGER, M.B.; CROSS, G.D.R; MADILL, D.; BLACK, D., ROSENWAX, A.; ROSE, K.; ALLEY, M.; FORSHAW, D., RUSSELL-BROWNS, I.; JOHNSTONE, A.C.; MARTIN, P.; O'BRIEN, C.R; LOVE, D.N. Avian cryptococcosis. **Medical mycology**, v.41, p.115-124, 2003.

MONTENEGRO, H.; PAULA, C.R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* in the city of São Paulo-Brazil. **Medical Mycology**, v.38, n.05, p.385-390, Oct. 2000.

NCCLS. Método de referência para testes de diluição antifúngica das leveduras norma aprovada—segunda edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). **NCCLS**, 940 West Valley (Road Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

PADHYE, A.A.; CHAKRABARTI, A.; CHANDER, J.; KAUFMAN, L. *Cryptococcus neoformans* vari *gattii* in the Índia. **Journal of Medical end Veterinary Mycology**, v.31, p.165-168, 1993.

PAL, M. Natural occurrence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in wooden cages. **Revista Ibero Americana de Micologia**, v.12, p.93-94, 1995.

PEREIRA, T.D. Criptococose. **Universidade Federal do Espírito Santo**, 2001.

QUEIROZ-TELLES, F.; RABELO, L.M.; MURO, M.; VARGAS, C.B.; ALMEIDA, S.M. Criptococose por *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, com resposta favorável com itraconazol. Tema livre apresentado durante o XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte-MG. **Anais...**, p.97, 1997.

RUBIO, M.; DE VROEY, C.; CHALON, E.; SWINNE, D. An improved medium for the isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeons droppings. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.22, p.345-346, 1984.

RUIZ, A.; VELEZ, D.; FROMTLING, R.A. Isoaltion of saprophytic *Cryptococcus neoformans* form Puerto Rico: distribution and variety. **Mycopathology**, v.106, p.167-170, 1989.

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

SILVA, M.E.; PAULA, L.A. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excrementos e ninhos de pombos (*Columbia livia*) em Salvador, Bahia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.5, p.9-11, 1963.

SOARES, M.C.B.; PAULA, C.R.; DIAS, A.L.T.; CASEIRO, M.M.; COSTA, S.O.P. Enviromental straits of *Cryptococcus neoformans* variedade grubii in the city of Santos, São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, n.01, jan./fev. 2005.

TAY, S.T.; CHAI, H.C.; HANIMAH, S.L.N.; ROHANII, H.M.Y.; SOO-HOO, T.S. The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from bird excreta in klang Valley, Malaysia. **Mycopathologia**, v.159, p.509-513, 2005.

ANEXOS

ANEXO I

Para os Quadros 1, 2 e 3, consideramos – (como negativos para crescimento) e + (como positivo para crescimento), assim podemos encontrar a CMI para cada um dos antifúngicos testados.

QUADRO 1 - RESULTADO PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE AO FLUCONAZOL

Hospital de Clínicas						CEASA					
amostra	02	39	44	45	47	56	57	73	74	80	81
µg/mL											
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: O autor

QUADRO 2 - RESULTADOS PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE A ANFOTERICINA B

Hospital de Clínicas						CEASA					
amostra	02	39	44	45	47	56	57	73	74	80	81
µg/mL)											
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
0,250	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
0,125	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
0,06	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
0,03	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-

Fonte: O autor

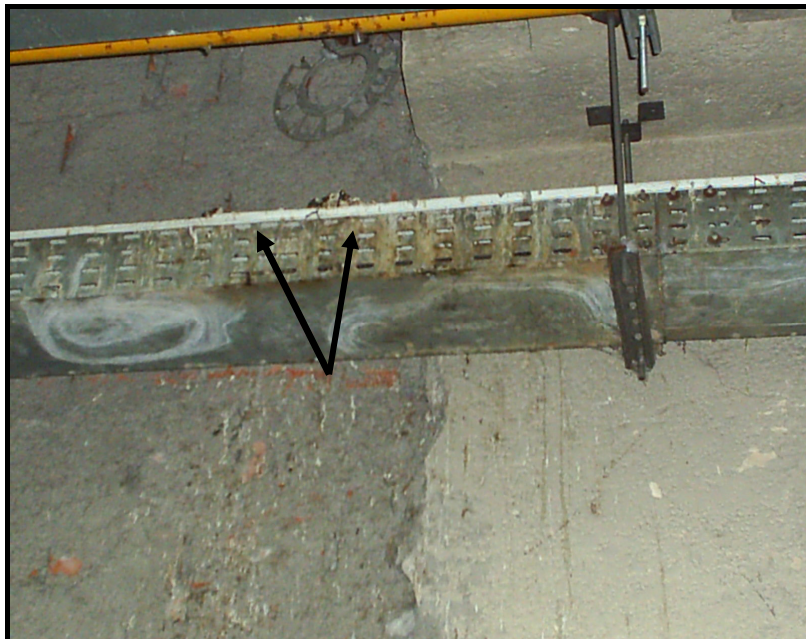
QUADRO 3 - RESULTADOS PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE AO ITRACONAZOL

	Hospital de Clinicas					CEASA					
amostra	02	39	44	45	47	56	57	73	74	80	81
$\mu\text{g/mL}$											
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: O autor

ANEXO II

FIGURA 1 - MOSTRA ACÚMULO DE FEZES NAS CANALETAS DO SETOR DE MANUTENÇÃO DO H.C, ESTE LOCAL FOI POSITIVO PARA A AMOSTRA 39



Legenda: —> Indica o acúmulo de fezes nas canaletas da manutenção do H.C.

Fonte: O autor

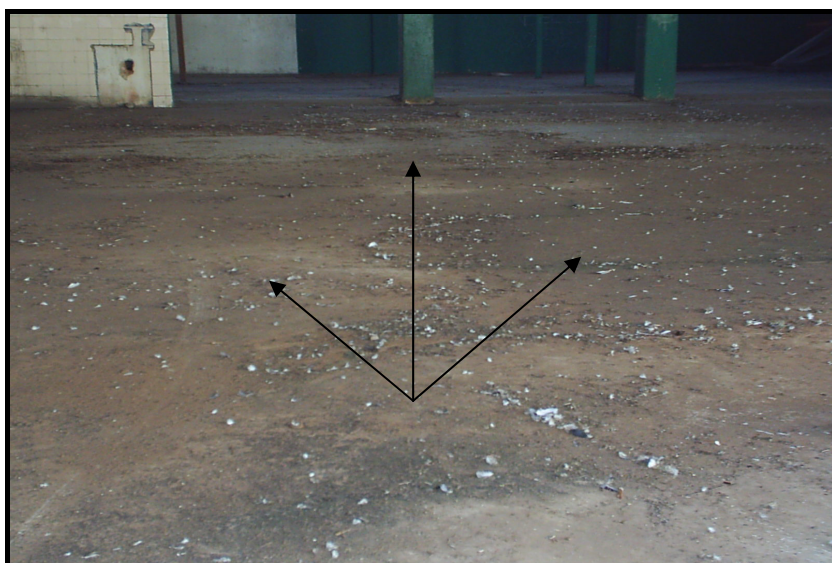
FIGURA 2 - MOSTRA ESCADA DO PRÉDIO DESATIVADO DO CEASA, ESTE LOCAL FOI POSITIVO PARA ISOLAMENTO DA AMOSTRA 57



Legenda: —> Indica o acúmulo de fezes na escada do prédio do CEASA

Fonte: O autor

FIGURA 3 - MOSTRA O PISO DO PRÉDIO INTERDITADO DO CEASA, ESTE LOCAL FOI POSITIVO PARA O ISOLAMENTO DA AMOSTRA 81



Legenda: —> Indica o acúmulo de fezes por todo o piso do prédio interditado do CEASA

Fonte: O autor

FIGURA 4 - MOSTRA VIGAS DE MADEIRA DO TELHADO DO PRÉDIO DO CEASA, A AMOSTRA DESTA LOCAL FOI POSITIVA PARA O ISOLAMENTO DA AMOSTRA 74



Legenda: —> Indica o acúmulo de fezes sobre as vigas caídas

Fonte: O autor

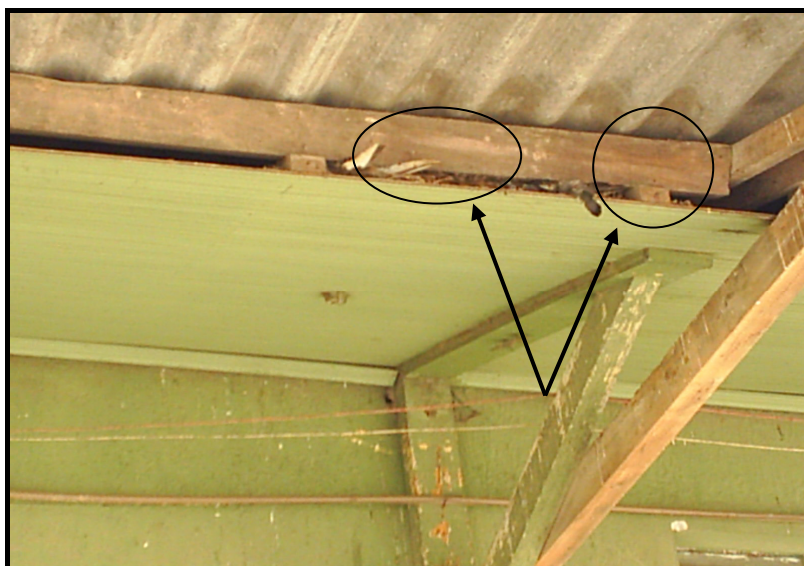
FIGURA 5 - MOSTRA ACÚMULO DE FEZES DENTRO DO PRÉDIO INTERDITADO DO CEASA, ESTA AMOSTRA FOI POSITIVA PARA O ISOLAMENTO DA AMOSTRA 73



Legenda: —→ Indica o acúmulo de fezes próximas a porta

Fonte: O autor

FIGURA 6 - MOSTRA O TELHADO DO ESTACIONAMENTO DO CEASA ONDE SE ENCONTRAM 2 POMBAS MORTAS JUNTO AS FEZES DE POMBO, A AMOSTRA DESTA LOCAL FOI POSITIVA PARA O ISOLAMENTO DA AMOSTRA 80



Fonte: O autor

FIGURA 7 - MOSTRA O PRÉDIO INTERDITADO, DESTE LOCAL FORAM COLETADAS DIVERSAS AMOSTRAS DE FEZES DE POMBO QUE FORNECERAM SEIS ISOLADOS DE *C. neoformans* PARA ESTE TRABALHO



Fonte: O autor

Este prédio fica na esquina das ruas professor Nivaldo Braga e Prefeito Mauricio Fruet, no bairro Capão da Imbuia.

ANEXO III

TABELA 1 -MOSTRA AS AMOSTRAS POSITIVAS PARA DESENVOLVIMENTO DO *C. neoformans* ENCONTRADAS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS, INCLUINDO LOCAL E DATA DE COLETA

Número da amostra	Local da coleta	Data da coleta
02	fisioterapia do HC (janela)	21/09/04
39	canaleta da manutenção	19/02/05
44	Rampa de acesso (HC)	09/04/05
45	2ª canaleta da manutenção	09/04/05
47	Parede do prédio	09/04/05

Fonte: O autor

TABELA 2 -MOSTRA AS AMOSTRAS POSITIVAS PARA DESENVOLVIMENTO DO *C. neoformans* ENCONTRADAS NO CEASA, INCLUINDO LOCAL E DATA DE COLETA

Número da amostra	Local da coleta	Data da coleta
56	1ª escada CEASA	11/06/05
57	2ª escada CEASA	11/06/05
73	Prédio interditado (Parede)	30/07/05
74	Prédio interd. embaixo das vigas	30/07/05
80	Telhado do estacionamento (CEASA)	07/08/05
81	Prédio desativado (antigo CEASA)	07/08/05

Fonte: O autor

ANEXO IV

QUADRO 1 -COMPARATIVO ENTRE OS RESULTADOS DE CURITIBA E OS UTILIZADOS COMO BASE

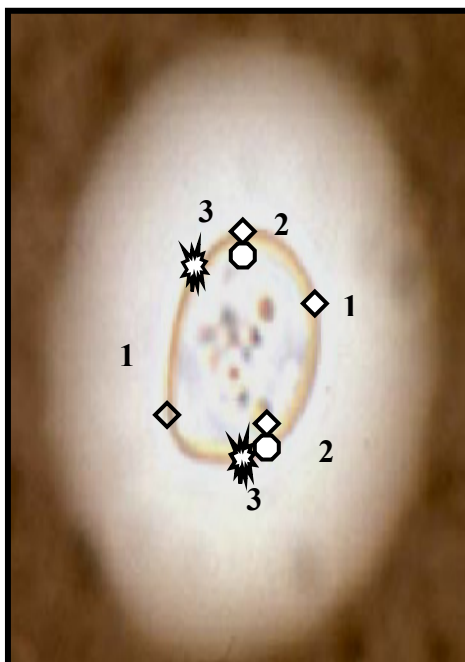
Estudo \ Droga	anfotericina B	fluconazol	itraconazol
CURITIBA	0.03 a 1 µg/mL	0.125µg/mL	0.03µg/mL
CALVO et al.	0.125 a 0.5µg/mL	4 a 8µg/mL	0.06 a 0.125µg/mL
KOBAYASHI et al.	0.015 a 0.125µg/mL	0.250 a 2 µg/mL	0.06 a 0.12µg/mL
SOARES et al.	0.25 a 1 µg/mL	0.012 a 1 µg/mL	0.015 a 0.06 µg/mL
TAY et al.	1µg/mL	8µg/mL	0.125 µg/mL

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - LISTA DAS DROGAS UTILIZADAS E DILUIÇÕES TESTADAS

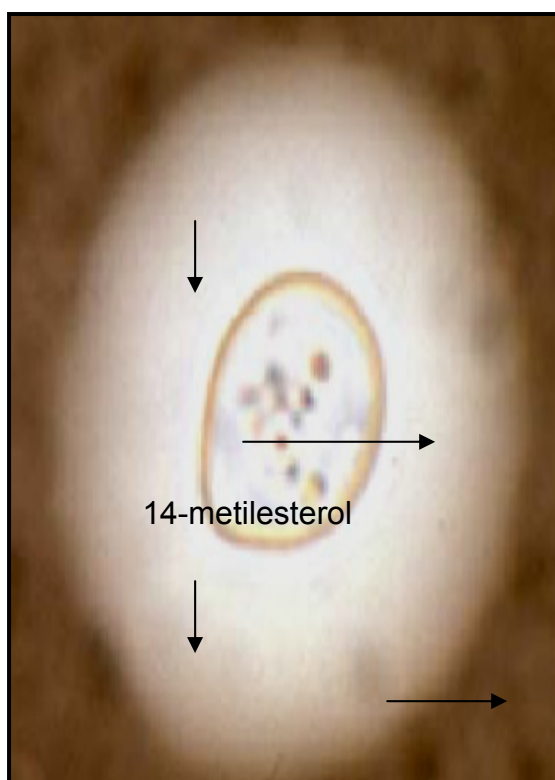
anfotericina B	fluconazol	itraconazol
16µg/mL	64µg/mL	16µg/mL
8µg/mL I	32µg/mL	8µg/mL
4µg/mL	16µg/mL	4µg/mL
2µg/mL	8µg/mL	2µg/mL
1µg/mL	4µg/mL	1µg/mL
0,5µg/mL	2µg/mL	0,5µg/mL
0,25µg/mL	1µg/mL	0,25µg/mL
0,125µg/mL	0,5µg/mL	0,125µg/mL
0,06µg/mL	0,25µg/mL	0,06µg/mL
0,03µg/mL	0,125µg/mL	0,03µg/mL

Fonte: NCCLS

APÊNDICE 2 - AÇÃO DA ANFOTERICINA B SOBRE O *C. neoformans*

Legenda: (1) Ergosterol; (2) União dos Poliênicos da anfotericina B com o ergosterol na membrana do fungo; (3) Poro formado na membrana do fungo, ocasionando desequilíbrio osmótico e morte da célula.

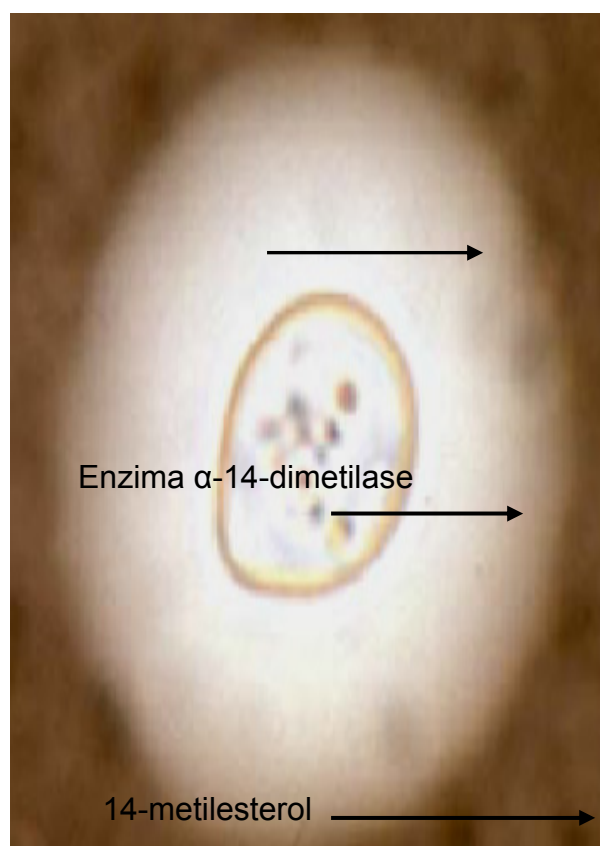
APÊNDICE 3 - FORMAÇÃO CORRETA DO ERGOSTEROL



Converte o 14-metilesterol em Ergosterol

Ergosterol e formado e depositado na membrana celular

APÊNDICE 4 - AÇÃO DOS AZÓIS NA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO ERGOSTEROL



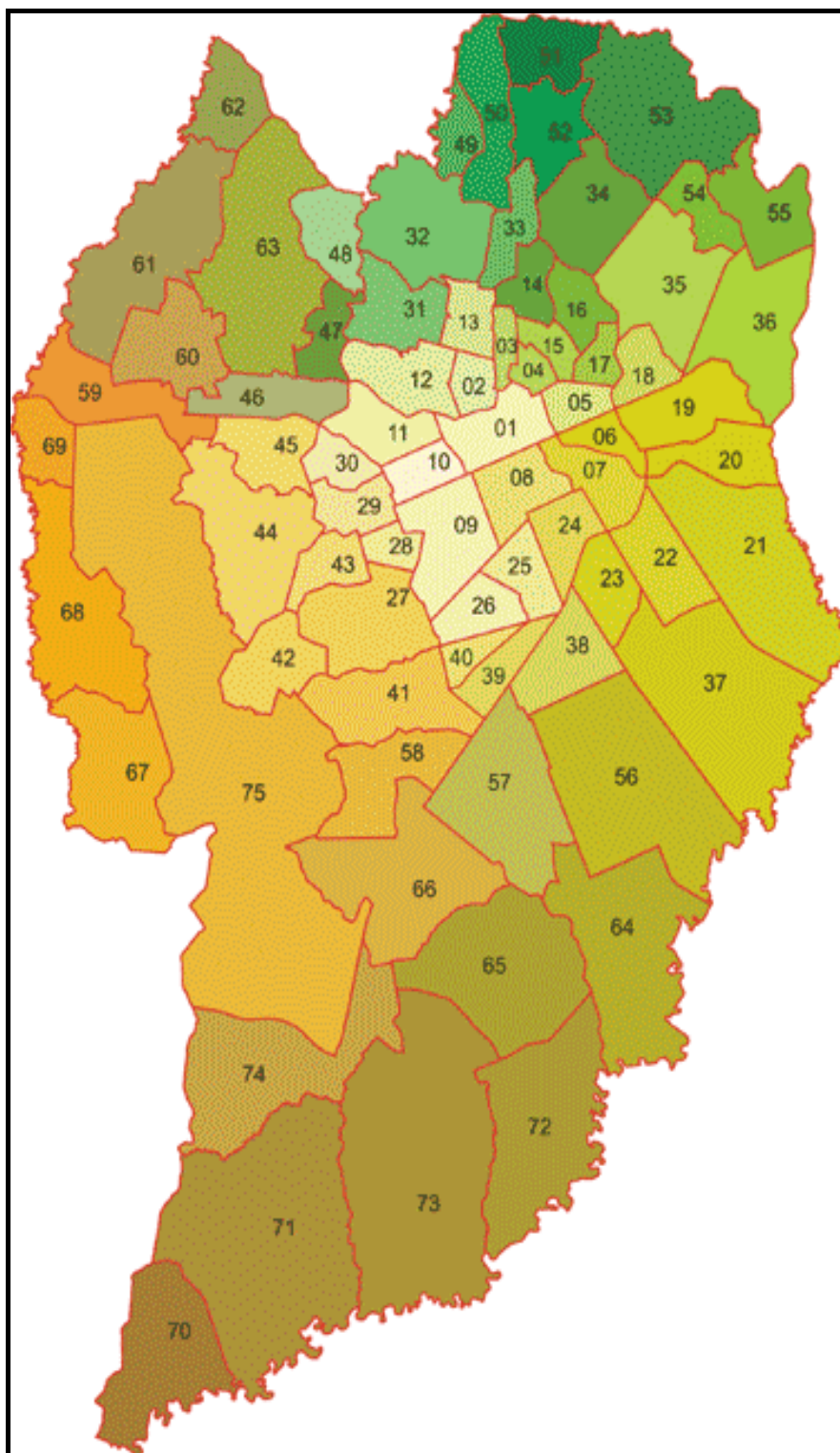
Não ativação da
enzima α -14-dimetilase

A enzima não converte o
14-metilesterol em
Ergosterol

Acúmulo de 14-metilesteróis
na membrana do fungo,
estes não possuem as
mesmas características, e
assim a célula morre.

Fonte: BERGOLD e GEORGIADIS (2004)

APÊNDICE 5 - BAIRROS DE CURITIBA E TIPO DE AMOSTRAS COLETADAS



01-Centro da cidade, Praças Santos Andrade e Rui Barbosa, coleta de amostras de fezes de pombos.

03- Centro Cívico, coleta de fezes de pombos do Passeio Público.

04- Bairro Alto da Glória, Praça Portugal e Hospital de Clínicas, coleta de amostras de fezes de pombos.

05-Bairro Alto da XY, coleta de amostra de fezes de morcego.

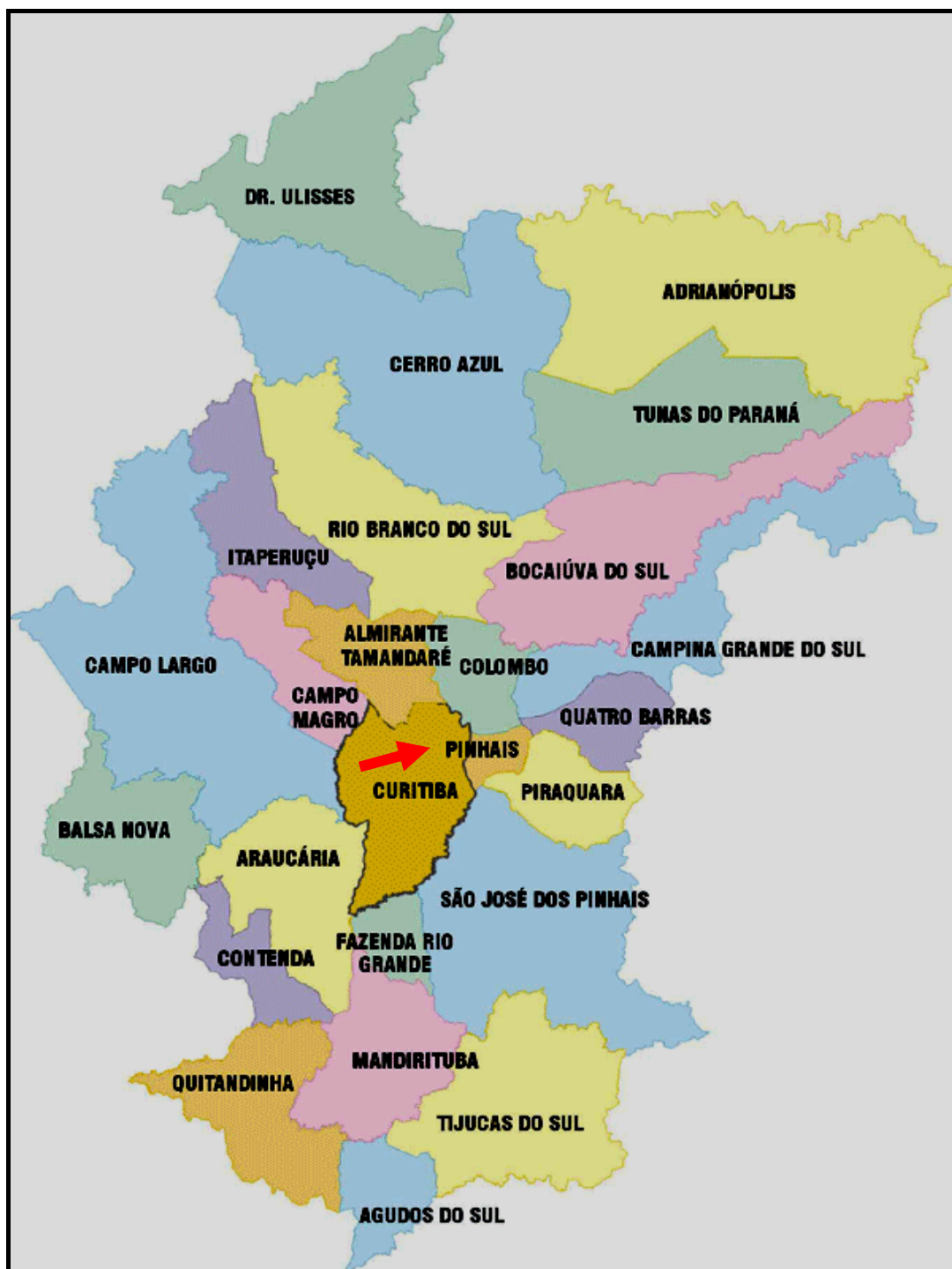
19- Bairro Taramã, Jockey Club de Curitiba, coleta de amostras de fezes de pombos.


20- Bairro Capão da Imbuia, CEASA, coleta de amostras de fezes de pombos.

22- Bairro Jardim das Américas, Centro Politécnico, coleta de restos vegetais de eucaliptos.

63- Bairro Santa Felicidade, coleta de amostras de fezes de pombos.

APÊNDICE 6 - CIDADE DE PINHAIS (REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA)



Legenda:  Indica a Cidade de Pinhais, onde fica o Moinho Molino Rosso, de onde foram coletadas amostras de fezes de pombos

Fonte: www.curitiba-parana.net/mapas/regiao-metropolitana

APÊNDICE 7 -MOSTRA OS ESCORES PADRONIZADOS PELA CLSI PARA DETERMINAÇÃO DE POSITIVIDADE OU NEGATIVIDADE NO CRESCIMENTO DO FUNGO NO POÇO

Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4
Oticamente claro	Creascimento indefinido	Redução proeminente do creascimento	Ligeira redução do creascimento	Nenhuma redução do creascimento

Fonte: Documento M27-A2 da NCCLS, atualmente denominada CLSI

**Suscetibilidade a drogas antifúngicas de isolados ambientais de
Cryptococcus neoformans, procedentes da cidade de Curitiba e Região
Metropolitana, Paraná, Brasil.**

Mauricio Cichon*, Vânia Aparecida Vicente*, Marisol Domingues Muro**, Gisele Pesquero***,
Flávio Telles*,***

* Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

** Laboratório de micologia clínica do Hospital de Clínica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba,
PR.

*** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

RESUMO

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada causadora da criptococose, tendo como porta de entrada às vias aéreas superiores e disseminando-se pela via hematogênica até o sistema nervoso central. As principais fontes de isolamento ambiental são as fezes secas e acumuladas de pombos (*Columba lívia*). São apresentados neste estudo os resultados da análise de 11 isolados de *C. neoformans* provenientes de 88 amostras de materiais orgânicos (principalmente fezes de pombos). Os isolados foram testados quanto à sensibilidade frente os antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol, onde o *C. neoformans* não apresentou resistência às drogas testadas: as Concentrações Mínimas Inibitórias encontradas foram: CIM de 0,03 a 1 µg/mL para anfotericina B com média de 0,515µg/mL, CIM de 0,125µg/mL para fluconazol e CIM de 0,03µg/mL para itraconazol.

Palavras chave: *C. neoformans*, pombos, isolamento ambiental, antifúngicos.

Abstract

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast responsible for cryptococcosis, having as body entry the upper respiratory tract and being spread around through hematogenous via. The main sources of environment isolation are the pigeons dried droppings (*Columba livia*). In this study we show results of 11 isolates from *C. neoformans* from 88 samples of organic material (mainly pigeons dried dropping). The samples was tested regarding its sensibility against antifungal as anfotericina B, fluconazol and itraconazol, where the *C. neoformans* did not present resistance to the tested drugs: the minimum inhibit concentrations (MIC) found was: MIC from 0.03 to 1ug/mL for anfotericina B with a reate of 0.515ug/mL; CIM of 0.125ug/mL for fluconazol and CIM of 0.03ug/mL for itraconazol.

Key –words: *C. neoformans*, pigeon, isolation, antifúngics

Introdução

A criptococose é uma micose sistêmica causada por uma levedura encapsulada do gênero *Cryptococcus* que apresenta tropismo pelo sistema nervoso central (SNC) ¹⁰, esta levedura taxômicamente classifica-se da seguinte forma; Domínio Eukaryota, reino Fungi, divisão Basidiomycota, espécie Hymenomyces e família Tremellomycetidae. *C. neoformans* era usualmente classificado dentro de 3 variedades, *C. neoformans* variedade *neoformans*, *C. neoformans* variedade *gattii* e *C. neoformans* variedade *grubii*, entretanto ¹⁰, recentes estudos moleculares indicam que a variedade *gattii* deve ser reconhecida como uma nova espécie, tal reconhecimento separa-as molecularmente baseando-se na análise por AFLP (Analyse Fragment Length Polimorphism), que revelou a existência de 2 principais genótipos, a espécie *C. neoformans* (AFLP genótipos 1 a 3) e *C. gattii* (AFLP genótipos 4 a 6). Ambas as

espécies iniciam sua infecção afetando pulmões e posteriormente disseminam-se pelo sistema nervoso central através da via hematogênica, porém, apresentam diferenças quanto à distribuição geográfica, características genotípicas, epidemiológicas, clínicas e resposta terapêutica^{01, 07}.

Os primeiros trabalhos realizados no início dos anos 50, fazem referência ao acúmulo de excretas secas e envelhecidas de pombos (*Columba lívia*) em ambientes urbanos considerando-as como fontes saprobióticas de *C. neoformans*. STAIB concluiu que a exposição dos homens e animais à excretas destas aves explica a epidemiologia da criptococose^{06, 15, 20}.

A contaminação de excretas de aves de cativeiro, como canários, periquitos, papagaios e pombos, por *C. neoformans* variedade *neoformans* foi demonstrada na cidade de Campo Grande por FILIÚ (2000), comprovando a existência de fontes ambientais que possibilitam a inalação dos propágulos também dispersos no ar⁰⁶.

LAZERA et al (2000) ao analisar 32 ocos de árvores isolou 123 colônias de *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* e *Cryptococcus gattii*, correspondendo a 18,5% de positividade, as espécies ocorreram sozinhas e em conjunto nestas amostras. Este é o primeiro relato em que estas duas espécies colonizam um mesmo ambiente natural, estabelecendo um possível ciclo de vida e sugerindo-se desta forma o primeiro nicho natural para estas espécies¹¹.

Cryptococcus gattii (sorotipos B e C) é conhecido por sua afinidade com matéria orgânica viva, esta espécie ocorre em regiões tropicais e subtropicais acometendo hospedeiros imunocompetentes. Foi inicialmente associado à *Eucalyptus camaldulensis* na Austrália, seguindo-se seu isolamento de restos vegetais de eucaliptos em diversas partes do mundo^{05, 15}.

Particularmente no Brasil *C. gattii* foi isolado de oco de árvores tropicais como o oiti (*Moquilea tomentosa*), cássia rosa (*Cassia grandis*), figueira (*Ficus microcarpa*) e outros, evidenciando diferentes habitats naturais para essa espécie, apresentando-se de forma endêmica nas regiões Norte e Nordeste. O sorotipo A, variedade *grubii*, é o sorotipo prevalente em amostras ambientais, como excrementos de pombos, restos de vegetais e ar atmosférico. Tal associação com excretas de pombos é bem conhecida, assim como sua prevalência em casos de meningite fúngica^{5, 13}. Isolados de *C. neoformans* variedade *grubbi* isolados de amostras de fezes de pombos coletadas em locais fechados, o que ocasionam ressecamento da amostra, favorecendo o desenvolvimento do *C. neoformans* que é resistente a esta condição, enquanto que outros microrganismos não se desenvolvem. A contaminação por *C. neoformans* variedade *grubii* é maior em locais protegidos do que em locais não protegidos das intempéries ambientais⁰⁸.

A Criptococose clínica é raramente observada em aves, principalmente pombos, devido à alta temperatura corporal de 40 a 44°C, porém experimentos documentam que o trato digestivo de pombos pode ser colonizado por *C. neoformans* e quando estes são excretados junto com as fezes, continuam viáveis, sugere-se também que a excreta dos pombos poderia enriquecer o solo, fornecendo nutrientes para o desenvolvimento do *C. neoformans* presente no ambiente¹².

A criptococose é tratada com anfotericina B, o fluconazol e o itraconazol aos quais *C. neoformans* não apresenta resistência. A anfotericina B tem como alvo a membrana celular (ergosterol) dos fungos formando poros que resultam no aumento da permeabilidade celular causando um desequilíbrio osmótico e morte da levedura. O fluconazol e itraconazol são compostos totalmente sintéticos e seu

mecanismo de ação consiste na inibição do α -14-dimetilase, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática.

Analisando-se 100 isolados clínicos de *C. neoformans* provenientes de pacientes HIV (+) e HIV (-) originários do Brasil, Chile e Venezuela e testando a suscetibilidade dos mesmos frente a quatro drogas antifúngicas: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-Flucitocina., utilizado-se o método de microdiluição em caldo RPMI padronizado pela CLSI, CALVO et al (2001) demonstraram que nenhum dos isolados apresentou resistência aos antifúngicos testados, fato observado nos demais trabalhos comparados. As concentrações mínimas inibitórias (CMI) encontradas foram: para anfotericina B (entre 0,125 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$), Fluconazol (entre 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$) e Itraconazol (entre 0,06 e 0,125 $\mu\text{g/mL}$)⁴.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A cidade de Curitiba, capital do estado do Paraná, localizada no primeiro planalto paranaense, à 934,6 metros do nível do mar, apresenta clima subtropical úmido, com umidade relativa do ar aproximando-se de 90% e temperatura média de 16,5°C. Os índices pluviométricos alcançam 1500 mm em média por ano, Curitiba possui aproximadamente 1 757 904 habitantes²¹.

Coleta, isolamento, identificação dos isolados e testes de sensibilidade.

Para coleta foram escolhidos locais com acúmulo de fezes e com grande população de pombos como: Hospital de Clínicas da UFPR, Parques de Curitiba, Praças de Curitiba, CEASA (Central Estadual de Abastecimento) de Curitiba, moinho de farinha de trigo, situado na cidade de Pinhais.

Foram coletadas amostras de fezes de pombos e morcegos, terra e areia com excrementos, materiais orgânicos como fragmentos de flores, caules e folhas de

eucaliptos. As coletas foram realizadas no período de 13 meses (setembro de 2004 a setembro de 2005), onde coletou-se aproximadamente 30 gramas de cada amostra, acondicionando-as em coletores plásticos esterilizados, os materiais foram processados no laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR aonde foi utilizado o método de STAIB²⁰ modificado em que o isolamento é feito em ágar níger. O ágar níger possui extrato da semente *Guizotia abyssinica*, rica em fenóis e utilizada largamente por pássaros como alimento. A identificação dos isolados foi realizada por métodos morfológicos e fisiológicos. Dentro dos testes fisiológicos pesquisou-se a ação da uréase, capacidade de assimilação de carboidratos (Auxanograma), além da pesquisa da enzima fenol-oxidase feita inicialmente em ágar níger, testou-se também a termotolerância a 35°C^{01, 05, 09}. Na tentativa de se identificar o *C. gatti*, todos os isolados foram semeados em àgar CGB (Cavanina, Glicina e azul de bromotimol), para isolamento diferencial das espécies^{01,08}. As amostras positivas foram testadas quanto a sua sensibilidade frente a antifúngicos utilizando-se o método de microdiluição em caldo RPMI 1640, este método é apresentado no manual da CLSI documento M27 A2¹³. A determinação de concentração mínima inibitória para cada uma das drogas seguiu o critério determinado pela CLSI, onde para anfotericina B, foi adotado o escore 0 (oticamente claro) e para fluconazol e itraconazol, foi adotado escore 2¹⁴. A leitura para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) é alcançada com leitura de 48 horas, apresentando resultados confiáveis e breakpoints visíveis^{13, 17}.

Os isolados de *C. neoformans* são considerados resistentes as drogas testadas quando sua concentração mínima inibitória (CMI) for ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B, se ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol e se ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ para Itraconazol¹⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Das 88 amostras coletadas, 11 apresentaram positividade para o desenvolvimento do *C. neoformans*, com uma taxa de 12,5% que apresenta conformidade com a literatura. Todas as amostras positivas neste estudo foram obtidas de locais com grande concentração de pombos, protegidos das intempéries e ao abrigo da luz solar, fornecendo amostras de fezes secas e em grande quantidade. A positividade destas amostras ocorre devido à capacidade do *C. neoformans* em resistir a ambientes ressecados sobrevivendo, enquanto que outros microrganismos morrem em situações adversas como as encontradas nestas amostras. Das 10 amostras do Hospital de Clínicas de Curitiba, 5 apresentaram positividade para o desenvolvimento do *C. neoformans*, assim como o CEASA de Curitiba que apresentou outras 6 amostras positivas das 6 amostras coletadas. As outras 77 amostras de diversos materiais não apresentaram positividade para o desenvolvimento do *C. neoformans*.

Tabela 1. Mostra os locais de coleta, tipos e quantidades de amostras que apresentaram resultado negativo para o desenvolvimento do *C. neoformans*.

<i>Local de coleta</i>	<i>tipo de amostra</i>	<i>número de amostras</i>
Praça 01	fezes	05
Praça 02	fezes	05
Praça 03	fezes	05
Centro Universitário	fragmentos de eucalipto	10
Moinho de trigo	fezes	06
Prédio residencial	fezes de morcego	01
Galinheiros	terra e areia	10
Parque 01 II	material vegetal	10
Centro esportivo	fezes	10
Parque 02	fezes	05
Condomínio residencial	fezes	05
Arredores do Hospital	fezes	05
Total		77

Segundo KOBAYASHI et al (2005) isto ocorre por que amostras que apresentam-se úmidas, criam ambiente favorável ao desenvolvimento de bactérias, que alcalinizam a amostra e inibem o desenvolvimento do *C. Neoformans*. Amostras coletadas em um centro esportivo encontravam-se cobertas e em grande quantidade, porém, estavam úmidas, portanto, não apresentaram desenvolvimento do fungo⁰⁸.

Os 11 isolados foram caracterizados como *C. neoformans*, quando semeados em ágar CGB que apresenta positividade apenas para *C. gattii*, não apresentaram tal mudança de cor, portanto caracteriza o teste como negativo.

Quanto ao teste de suscetibilidade do *C. neoformans* frente aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol os resultados estão representados na TABELA 2, que mostra a CMI encontrada para a anfotericina B entre 0,03 e 0,5 µg/mL, para fluconazol de 0,03 µg/mL e para itraconazol de 0,03 µg/mL, estes resultados estão abaixo dos valores considerados como resistentes¹⁸ assim os isolados ambientais de *C. neoformans* testados neste estudo são sensíveis as drogas usadas. Estes resultados estão em conformidade com os apresentados em outros trabalhos que também não encontraram amostras de *C. neoformans* resistentes aos antifúngicos.

Tabela 02. Apresenta as amostras positivas, o local de coleta e a CMI encontrada por cada isolado em cada droga antifúngica.

Identificação	CMI anfotericina	CMI fluconaz.	CMI itracon.
02	0.03µg/mL	0.125µg/mL	0.03µg/mL
39	0.5µg/mL	0.125µg/mL	0.03µg/mL
44	0.5µg/mL	0.125µg/mL	0.03µg/mL
45	0.5µg/mL	0.125µg/mL	0.03µg/mL
47	0.03µg/mL	0.125µg/mL	0.03µg/mL
56	0.5µg/mL	0.125µg/mL	0.03µg/mL
57	0.03µg/mL	0.125µg/mL	0.03µg/mL
73	0.03µg/mL	0.125µg/mL	0.03µg/mL
74	0.03µg/mL	0.125µg/mL	0.03µg/mL
80	0.5µg/mL	0.125µg/mL	0.03µg/mL
81	0.03µg/mL	0.125µg/mL	0.03µg/mL

CONCLUSÕES

A cidade de Curitiba apresenta possíveis fontes ambientais para o desenvolvimento do *C. neoformans*. O método de Staib modificado apresentou eficácia no isolamento do *C. neoformans* proveniente de amostras ambientais. Fezes secas, em grande quantidade e protegidas das intempéries, apresentam melhores condições para o isolamento ambiental do *C. neoformans*, fato explicado por KOBAYASHI et al (2005)⁰⁸, como sendo uma habilidade do fungo em resistir a ambientes ressecados, enquanto que outros microrganismos morrem em tais condições, por outro lado, fezes úmidas alcalinizam-se pela ação de bactérias proporcionando ambiente desfavorável ao desenvolvimento do fungo. Os isolados de *C. neoformans* obtidos de amostras ambientais na cidade de Curitiba apresentaram, assim como em outros estudos realizados no Brasil e no mundo, suscetibilidade aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol, que são os medicamentos utilizados para o tratamento da criptococose. Os resultados para concentração mínima inibitória indicam que as amostras não são consideradas resistentes, já que segundo Soares (2005) um isolado de *C. neoformans* é considerado resistente quando apresentar concentração mínima inibitória (CMI) $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ para anfotericina B, se $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ para fluconazol e se $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ para Itraconazol¹⁷. A metodologia recomendada pela CLSI (Clinical laboratory Standart Institute), de micro-diluição em meio líquido RPMI 1640, tamponado com MOPS (ácido 3 (N-morfolino) propanosulfônico) apresenta-se como uma metodologia confiável para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) em isolados de *C. neoformans* em laboratórios de micologia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRETO DE OLIVEIRA et al. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **Journal of Microbiology**, v.42, p.1356-1359, 2004.
2. BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS. S. New antifungic drugs: A review. Curitiba-PR, **Visão Acadêmica**, v.5, n.2, p.159-172, dez. 2004.
3. BRANDT, M.E.; PFALLER, M.A.; HAJJED, R.A.; HAMIL, R.J.; PAPPAS, P.G.; REINGOLD, A.L.; RIMLAND, D.; WARNOK, D.W. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n.11, p. 3065-3069, Nov. 2001.
4. CALVO, M.B.; COLOMBO, A.L.; FISHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, M.L.; QUEIROZ-TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYUAI, M.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile and Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, p.2348-2350, Jun 2001.
5. ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.8, p.1642-1644, 1990b.
6. FILIÚ, W.F.; WANKE, B., AGUENA, S.M.; VILELA, V.O.; MACEDO, R.C.L.; LAZERÁ, M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, 2002.
7. KNOW-CHUNG, K; BOEKHOUNT, T; FELL, J.W.; DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **TAXON** n° 51, p. 804-806, 2002.

8. KOBAYASHI, C.C.B.A.; SOUZA, L.K.H.; FERNANDES, O.F.L.; BRITO, S.C.A.; SOUSA, E.D.; SILVA, M.R.R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás state, Brazil. São Paulo, 2005, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.47, p.203-207, jul./ago., 2005.
9. LACAZ, C.S.; HUGGINS, D.W.; PEREIRA, A.D.; NIGRON, N.T.M.R.C. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de pombos do solo e ninhos de pombos. **Revista Brasileira de Medicina**, v.44, p.6-9, 1987.
10. LAZERA, M.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.31, p.449-454, 1993.
11. LAZÉRA, M.S.; SALMITO CAVALCANTI, M.A.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v.38, p.379-83, 2000.
12. MALIK, R.; KROCKENBERGER, M.B.; CROSS, G.D.R; MADILL, D.; BLACK, D., ROSENWAX, A.; ROSE, K.; ALLEY, M.; FORSHAW, D., RUSSELL-BROWNS, I.; JOHNSTONE, A.C.; MARTIN, P.; O'BRIEN, C.R; LOVE, D.N. Avian cryptococcosis. **Medical mycology**, v.41, p.115-124, 2003.
13. MONTENRGRO, H; PAULA, CR. Enviromental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* in the city of São Paulo-Brazil. **Medical Mycology**. vol 38 number 05. October 2000, p. 385-390.
14. NCCLS. Método de referência para testes de diluição antifúngica das leveduras norma aprovada—segunda edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). **NCCLS**, 940 West Valley (Road Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
15. PADHYE, A.A.; CHAKRABARTI, A.; CHANDER, J.; KAUFMAN, L. *Cryptococcus neoformans* vari *gattii* in the Índia. **Journal of Medical end Veterinary Mycology**, v.31, p.165-168, 1993.

16. RUBIO, M.; DE VROEY, C.; CHALON, E.; SWINNE, D. An improved medium for the isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeons droppings. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.22, p.345-346, 1984.
17. SILVA, M.E.; PAULA, L.A. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excrementos e ninhos de pombos (*Columbia livia*) em Salvador, Bahia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.5, p.9-11, 1963.
18. SOARES, M.C.B.; PAULA, C.R.; DIAS, A.L.T.; CASEIRO, M.M.; COSTA, S.O.P. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variedade grubii in the city of Santos, São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, n.01, jan./fev. 2005.
19. STAIB, F.; SCHUULTZ-DIETERJCH, J. *Cryptococcus neoformans* in fecal matter of birds kept in cages: control of *Cryptococcus neoformans* habitats. **Zentralblatt für Bakteriologie und Parsitenkunde**, v. 174, n. 8, p. 79-186, 1984.
20. TAY, S.T.; CHAI, H.C.; HANIMAH, S.L.N.; ROHANII, H.M.Y.; SOO-HOO, T.S. The isolation, characterization and antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* from bird excreta in Klang Valley, Malaysia. **Mycopathologia**, v.159, p.509-513, 2005.
21. WIKIMÉDIA : <http:pt.wikimedia.org/wiki/curitiba>> acesso em 04/04/07.