

ARTIGO ORIGINAL / ARTÍCULO ORIGINAL

Presença do *Cryptococcus* spp. nas excretas de pombos nos arredores de Hospitais de Porto Alegre

Presence of *Cryptococcus* spp. in pigeon's excreta around Hospitals in the city of Porto Alegre

Adelina Mezzari¹

Adília Maria Pereira Wliebbelling²

Camila Wenczenovicz³

Carla Daniele Amorim de Souza³

Gabriela Souza de Oliveira Freitas³

Leonardo Disconzi Barboza³

Ludmyla Duarte Pena³

Natasha Kissmann³

Júlia Plentz Portich⁴

Lilian Carla Carneiro⁵

Paulo Renato Petersen Behar⁶

Rev Panam Infectol 2014;16(3):153-160

Conflito de interesses: nenhum

Recebido em 7/8/2013

Aceito para publicação em 10/7/2014

¹Prof. Associada da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA) e da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Prof. Assistente da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre, RS, Brasil.

³Acadêmicos do Curso de Medicina da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴Acadêmica do Curso de Medicina da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre, RS, Brasil.

⁵Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás e Programa de pós-doutorado em Patologia da UFCSA, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁶Professor Adjunto de Infectologia da UFCSA., Porto Alegre, RS, Brasil. Chefe do Serviço de Infectologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

RESUMO

Introdução: criptococose é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Cryptococcus* spp., o qual possui duas espécies clinicamente relevantes, a *neoformans* e a *gattii*. A entrada do fungo no organismo ocorre pela via inalatória. O *Cryptococcus neoformans* é encontrado geralmente em excretas de pombos e outras aves, enquanto a espécie *gattii* é mais comum em plantas principalmente o eucalipto. Na era dos transplantes e da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), a frequência da doença tem aumentado, sendo a primeira nos casos de SIDA no Brasil, predominando nas regiões sul e sudeste. A criptococose pelo *Cryptococcus neoformans* predomina em pacientes imunodeprimidos, e o *Cryptococcus gattii* em pacientes imunocompetentes. **Objetivos:** o presente estudo teve como objetivo verificar a presença de *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos coletadas nas proximidades de Hospitais de Porto Alegre, identificar as espécies do fungo e os locais com maior prevalência e também correlacionar a presença do fungo com as estações do ano. **Métodos:** foram coletadas 168 amostras de excretas de pombos nos arredores de seis Hospitais de Porto Alegre no período de junho de 2011 a novembro de 2012. As amostras foram processadas e identificadas laboratorialmente. Para confirmação molecular, os isolados característicos do gênero *Cryptococcus* foram submetidos à extração de DNA utilizando o kit de extração MycXtra (Myconostica, UK). A partir do DNA extraído, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o seqüenciamento. **Resultados:** o fungo *Cryptococcus* spp. foi isolado em 11 amostras (6,54%) e em dez amostras (5,95%) foram confirmadas pelo seqüenciamento, uma amostra como *C. neoformans* var. *grubii*, em dois isolados como *C. albidus* e as outras sete amostras como tendo homologia com o *Cryptococcus* spp. Houve isolamento de amostras positivas em todas as estações do ano. **Conclusões:** a prevalência deste fungo é elevada em Hospitais em Porto Alegre, principalmente na estação do inverno (12,5%). As espécies identificadas laboratorialmente foram *neoformans* e *gattii*, no seqüenciamento predominou o *Cryptococcus* spp., seguido do *C. albidus* e o *C. neoformans* var

grubii. O risco biológico desses potenciais agentes patogênicos no ambiente é de extrema importância para o controle epidemiológico da criptococose. O estreito contato do fungo com indivíduos que circulam em hospitais indica um potencial risco à saúde pública e aos imunodeprimidos.

Palavras chave: *Cryptococcus*; *Cryptococcus neoformans*; *Cryptococcus gattii*; *Columbidae* (Pombos); Criptococose

ABSTRACT

Introduction: cryptococcosis is a systemic mycosis caused by the fungus *Cryptococcus* spp., which has two species clinically relevant, *neoformans* and *gattii*. The fungus enters the organism by the respiratory system. *Cryptococcus neoformans* is commonly found in the feces of pigeons and other birds, while the variety *gattii* is observed in eucalyptus plants. In the era of transplantation and the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), the frequency of the disease has increased, the first being the AIDS cases in Brazil, predominating in the south and southeast. Cryptococcosis by *Cryptococcus neoformans* predominates in immunocompromised patients, and *Cryptococcus gattii* in immunocompetent patients. **Objectives:** this study aimed to verify the presence of *Cryptococcus* spp. in pigeon excreta collected nearby Hospitals of Porto Alegre City, and also identify locations with higher prevalence and correlate the presence of the fungus with different seasons. **Methods:** it was collected 168 samples of pigeon excreta around six hospitals in Porto Alegre from June 2011 to November 2012. The samples were processed and identified in laboratory. For molecular confirmation, the isolates characteristic of *Cryptococcus*, were subjected to DNA extraction using the extraction kit MycXtra (Myconostica, UK). From the extracted DNA was performed Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing. **Results:** the fungus *Cryptococcus* spp. was isolated in 11 samples (6,54%) and 10 samples (5,95%) confirmed by sequencing. in a sample as *C. neoformans* var. *grubii* in two isolates as *C. albidus* and seven other samples as having homology with *Cryptococcus* spp. Was isolated positive samples in all seasons. **Conclusions:** the prevalence of this fungus is high in hospitals in Porto Alegre, especially in the winter season (12.5%). The species were identified by laboratory *neoformans* and *gattii*, and in sequencing the predominant

Cryptococcus spp., followed by *C. albidus* and *C. neoformans* var. *grubii*. **Conclusions:** understanding the biological risk of these potential pathogens in the environment is extremely important for the epidemiological control of cryptococcosis. The close contact with individuals in urban areas and their movement by hospitals indicates a potential risk to public health, especially for immunosuppressed patients.

Keywords: *Cryptococcus*; *Cryptococcus neoformans*; *Cryptococcus gattii*; *Columbidae* (Pigeons); Criptococcosis

INTRODUÇÃO

Criptococose é uma infecção fúngica oportunista, que ocorre com maior frequência em pacientes imunodeprimidos. Predominam as formas infecciosas meningo-encefálica, disseminada e pulmonar⁽¹⁾.

Estudos relatam alta frequência deste fungo no Brasil, justificando o interesse pela investigação de fontes naturais do *Cryptococcus* spp.⁽²⁻³⁾. Duas espécies, o *C. neoformans* e o *C. gattii*, são as mais frequentes causadoras de doença. O *C. gattii* tem sido isolado em árvores, principalmente o eucalipto. O *C. neoformans* coloniza o trato digestório de pombos e outras aves⁽⁴⁾ estando a espécie presente nas excretas destas aves, onde os substratos orgânicos ricos em fontes de nitrogênio, como uréia e creatinina, favorecem a sobrevivência do fungo⁽⁵⁾. Em condições ambientais favoráveis formam-se microfocos do fungo em ambientes urbanos, com ampla disseminação e possíveis múltiplas exposições humanas⁽⁶⁻⁷⁾.

Com o advento dos transplantes e da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), na década de 1980, a frequência da doença por este fungo tem aumentado⁽⁸⁾. O Ministério da Saúde, aponta a criptococose como a primeira manifestação oportunista em 4,3% dos casos de SIDA no Brasil⁽⁸⁾. Estudos nacionais sobre criptococose, com 308 casos⁽⁸⁾ e com 171 casos, respectivamente⁽⁹⁾, revelaram que os casos de doença por *C. neoformans* em portadores de SIDA predominaram nas regiões sul e sudeste. Um estudo realizado no Maranhão e Piauí demonstrou que mais de 90% dos casos de criptococose em indivíduos imunocompetentes foram causados pelo *C. gattii*⁽¹⁰⁾.

Segundo Severo (1993)⁽¹¹⁾, a criptococose se manifesta de acordo com a variedade do fungo presente. O *Cryptococcus neoformans* predomina em pacientes imunodeprimidos, causando infecção generalizada, ao passo que o *Cryptococcus gattii* acomete pacientes imunocompetentes, predominando a manifestação pulmonar, ver Tabela 1.

Tabela 1. Principais diferenças entre *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Espécie	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
Paciente	Paciente imunodeprimido	Paciente imunocompetente
Infecção	Infecção generalizada	Infecção pulmonar
Localização	Excreta de aves	Eucaliptos e outras árvores

O presente estudo teve como objetivo verificar a presença de *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos coletadas nas proximidades de Hospitais de Porto Alegre, identificar as espécies do fungo, os locais com maior prevalência e correlacionar a presença do fungo com as estações do ano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de excretas de pombos nas calçadas que circundam e nas áreas externas de alguns grandes hospitais da cidade de Porto Alegre, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Hospital de Pronto Socorro (HPS), Hospital Moinhos de Vento (HMV), Hospital São Lucas da PUCRS (HSLP) e Grupo Hospitalar Conceição (GHC), todos eles locais de grande circulação de indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos. As coletas foram realizadas, quinzenalmente, no período de Junho/2011 a Novembro/2012, totalizando duas amostras por hospital a cada mês. Com o intuito de diferenciar as excretas de pombos das de outras aves, as coletas foram realizadas em locais onde foi observada a presença destas aves. É importante salientar que os pombos não foram submetidos a nenhum procedimento durante a realização do trabalho, sendo utilizadas somente as excretas presentes nas calçadas, respeitando os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal⁽¹²⁾ e as normas estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals⁽¹³⁾.

As amostras coletadas foram processadas no laboratório de Parasitologia e Micologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), por meio da cultura e identificação do fungo. Nos casos suspeitos de amostra positiva, esta foi submetida às provas da urease e da canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). O *Cryptococcus* spp. é urease positiva. O *C. gattii* é resistente à L-canavanina, e cresce no meio de CGB. O *C. neoformans*, sensível à L-canavanina⁽⁸⁾, não cresce neste meio de cultura.

Para confirmação molecular, os isolados de *Cryptococcus* confirmados na cultura, foram submetidos à extração de DNA utilizando o kit de extração MycXtra (Mycostica, UK). A partir do DNA extraído, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o seqüenciamento utilizando-se os primers:

- **ITS1** - 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e **ITS4** - 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (amplificam um fragmento do gene 18S do rDNA);
- **CaIF** - 5'-CCGACTCTTTGACYGARGAR-3' e **CaIR** - 5'-TTTYTGCATCATRAGYTGGAC-3'; (amplificam o gene da calmodulina).
- **NL1** - 5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3' e **NL4** - 5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3', (amplificam a região D1/D2 do gene 26S do rDNA).

O sequenciador utilizado foi o MegaBACE™ (Amersham Biosciences®). Os fragmentos seqüenciados foram analisados on line pelo software NCBI/Blast (BLAST® - Basic Local Alignment Search Tool).

RESULTADOS

As coletas das amostras ocorreram de Junho de 2011 a Novembro de 2012, totalizando 168 amostras. Destas, 31 (18,4%) provêm dos arredores do HCPA, 29 (17,3%) da área do HPS, 28 (16,7%) em volta do HSL, 32 (19%) circunvizinho ao HMV, 20 (11,9%) nas proximidades do GHC e 28 (16,7%) nas imediações da ISCOMPA. Após a análise laboratorial, 11 (6,54%) amostras apresentaram resultados positivos para *Cryptococcus* spp. Das amostras positivas, três (27,27%) provêm do HPS (agosto de 2011 e agosto de 2012), duas (18,18%) do HSL (agosto de 2011 e abril de 2012), três (27,27%) do GHC (setembro de 2011), uma (9,09%) do HMV (dezembro de 2011), uma (9,09%) do HCPA (março de 2012) e uma (9,09%) da ISCOMPA (setembro de 2012), ver Figura 1.

Foram isoladas amostras positivas em todas as estações do ano, ver Tabela 2. No inverno foram realizadas 56 coletas, sendo sete (12,5%) positivas. Na primavera, das 49 amostras coletadas, duas (4,0%) foram positivas, no verão foram realizadas

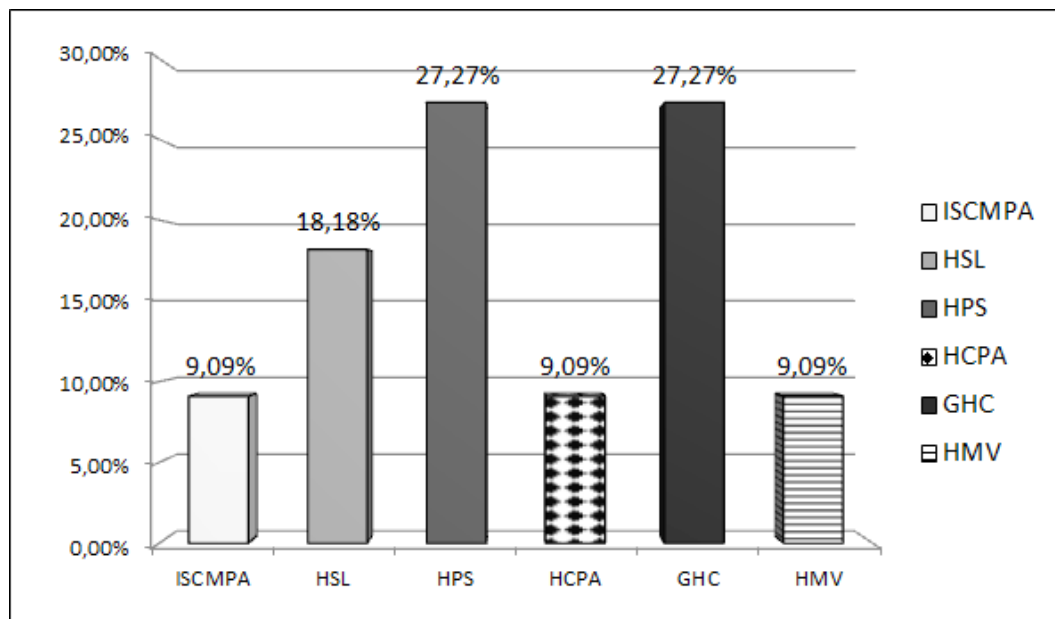


Figura 1. Percentual de amostras coletadas em fezes de pombos por hospital estudado- Porto Alegre- junho de 2011 a novembro de 2012

Tabela 2. Distribuição das amostras positivas de *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos com relação às estações do ano coletadas de junho de 2011 a novembro de 2012

Hospitais	Inverno	Primavera	Verão	Outono
HPS	3	0	0	0
HSL	1	0	0	1
ISCMPA	0	1	0	0
GHC	3	0	0	0
HCPA	0	0	1	0
HMV	0	1	0	0
Total Positivas	7	2	1	1
Porcentagem (%)	12,50	4,08	3,70	2,86
Total	56	49	27	35

27 coletas e no outono 35, nestas estações foram obtidas uma amostra positiva (3,7%) e (2,8%), respectivamente.

Das onze amostras positivas, quatro foram identificadas laboratorialmente como *Cryptococcus gattii*, e sete como *Cryptococcus neoformans*. Na confirmação molecular dez amostras amplificaram com pelo menos um conjunto de primers e uma não amplificou. As dez amostras que amplificaram e que foram submetidas ao sequenciamento confirmaram homologia para *Cryptococcus* spp. no programa Blast®, uma das seqüências (44 pares de bases) apresentou 92% de identidade para *Cryptococcus*

neoformans var. *grubii* (número de acesso: CP003831.1); outro isolado (381 pares de bases) apresentou 96% de identidade para *Cryptococcus albidus* (isolado KDLYL12-1; número de acesso: JX174413.1) e uma terceira amostra (569 pares de bases) apresentou 99% de identidade para *Cryptococcus albidus* (isolado KDLYL12-1; número de acesso: JX174413.1). As outras sete amostras, ao realizar o Blast®, apresentaram homologia com *Cryptococcus* spp.. O *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* foi encontrado na amostra coletada no HPS, um isolado de *Cryptococcus albidus* foi encontrado no HSL e o outro no HPS.

DISCUSSÃO

A presença do *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos tem sido avaliada ao longo dos anos, sobretudo em áreas urbanas como praças públicas, torres de Igreja e prédios. Faria (2010)⁽¹⁴⁾, encontrou uma frequência de 26% do *C. neoformans* em amostras analisadas na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Frequência semelhante foi encontrada em outras regiões do Brasil, variando de 25 a 27% em Porto Alegre, São Paulo e Rio de Janeiro⁽¹⁵⁻¹⁶⁾, e menor frequência em Minas Gerais (11,1%)⁽¹⁷⁾ e Santos, São Paulo (13,9%)⁽¹⁸⁾. Estas diferenças podem estar relacionadas ao habitat destas aves como abrigos para a construção de seus ninhos, disponibilidade de alimentos e ausência de predadores⁽¹⁹⁾.

A confirmação molecular dos achados positivos no presente estudo são semelhantes ao estudo de Silva et al. (2010)⁽²⁰⁾ em Minas Gerais onde foram avaliadas a virulência e a caracterização molecular de 62 excretas de pombos e 11 amostras de árvores. O *C. neoformans* foi isolado em 43,8% das amostras totais. Rustan et al (1992)⁽²¹⁾ relataram três casos de pacientes com SIDA internados no hospital local de Córdoba, para tratamento da doença. Após melhora clínica e a alta, todos retornaram ao hospital com meningite criptocócica. Após este fato, os pesquisadores analisaram as excretas de pombos presentes em diversas áreas do hospital onde encontraram oito amostras positivas para o *Cryptococcus* spp. entre dez coletas. Com estes dados, foi aventada a possibilidade dos três pacientes terem adquirido a infecção durante a internação hospitalar. Fato semelhante pode ser observado no presente estudo, através do isolamento do fungo nos arredores dos hospitais, ver figura 2, ao longo do período estudado.

Os hospitais GHC e HPS foram os locais com o maior número de amostras positivas para o *Cryptococcus* spp., totalizando três amostras em cada um. Este resultado pode ser relevante, pois o GHC e HPS são, entre os hospitais analisados, locais com circulação de muitas pessoas, principalmente pacientes imunodeprimidos. Os hospitais deste grupo foram responsáveis por 35% das internações pelo SUS no ano de 2009 em Porto Alegre. Dos três isolados, em ambos os hospitais, duas amostras foram *Cryptococcus gattii*, e uma *Cryptococcus neoformans*. No seqüenciamento, foi confirmada homologia para *Cryptococcus* spp., não evidenciando as espécies.

No Hospital São Lucas, juntamente com outras árvores está presente o *Eucalyptus* spp. Neste local, foram isoladas duas amostras positivas, uma de

Cryptococcus neoformans e outra do *Cryptococcus gattii*, o que induz a suspeita do fungo alojado nos eucaliptos. Esta espécie pode acometer pacientes imunocompetentes, sendo um potencial fator de gravidade a ser considerado pelo Hospital, quanto a proteção dos indivíduos que circulam neste local, visando diminuir o contato com os possíveis elementos infectantes do fungo⁽²²⁾. Estas duas espécies, no presente estudo, foram isoladas nas excretas dos pombos, semelhante a outro achado onde estas mesmas espécies foram isoladas de ocos de árvores⁽²²⁾.

Em todas as estações do ano foram isoladas amostras positivas para o *Cryptococcus* spp., ver Tabela 2. No entanto, a maioria destas amostras foi coletada no período do inverno. O clima de Porto Alegre é classificado como subtropical úmido (segundo a classificação climática de Köppen-Geiger), tendo como característica marcante a grande variabilidade entre as temperaturas. As chuvas são bem distribuídas. As características climáticas locais, em que a umidade do ar é elevada e não ocorrem temperaturas extremas, podem ter possibilitado o isolamento do *Cryptococcus neoformans* nestes ambientes abertos⁽¹⁹⁾. Assim, a distribuição das chuvas pode ter relação com a incidência de amostras positivas, uma vez que o maior número de amostras positivas foi encontrado nos meses de agosto e setembro, os mais chuvosos conforme distribuição de precipitação pluviométrica do período estudado, ver Figura 2. Dois estudos brasileiros revelaram que em São Paulo e no Rio de Janeiro e a taxa mais alta de isolados do *Cryptococcus* spp. foi durante o mês de novembro, primavera no Brasil^(16,19). Esses achados diferem dos resultados do presente estudo, permitindo questionar a possibilidade do *C. neoformans* ter um comportamento diferente no RS devido as diferenças climáticas. A temperatura é um fator que também pode influenciar na proliferação e sobrevivência dos fungos onde altas temperaturas podem inibir o crescimento ou inativar as estruturas de reprodução do *C. neoformans*⁽¹⁹⁾, tendo como consequência, redução na frequência dos isolados, fato não observado no presente estudo, onde o *Cryptococcus* spp. foi isolado em todas as estações do ano.

A técnica de PCR tem sido considerada a de maior especificidade para identificação e diferenciação do *Cryptococcus* spp.⁽²³⁾ em comparação a outras técnicas bioquímicas convencionais, porém seu custo, tempo de realização e tecnologia necessária fazem com que outras provas, como a urease e o CGB, sejam mais utilizadas na prática clínica⁽²⁴⁾. Sendo assim, ainda são poucos os estudos moleculares

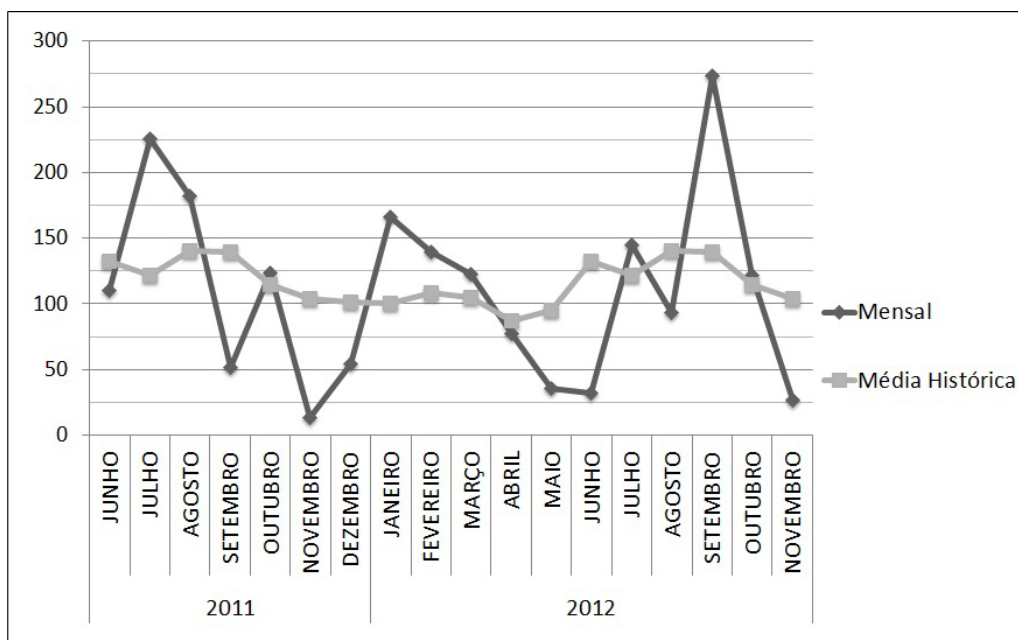


Figura 2. Distribuição de precipitação pluviométrica e média histórica mensal em Porto Alegre de junho de 2011 a novembro de 2012. (dados: INMET - Instituto Nacional de Meteorologia)

para identificação de amostras fúngicas isoladas do ambiente e da clínica.

O *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, identificado no seqüenciamento, tem distribuição mundial⁽²⁵⁾ e está sendo descrito como um agente de criptococose não *neoformans* em pacientes imunocomprometidos e acometidos principalmente por SIDA⁽²⁶⁾. O *Cryptococcus albidus*, isolado em duas amostras e identificado no seqüenciamento, tem sido descrito como fungo saprófita encontrado no ar, madeira, solo, excretas de pombos e alimentos. No entanto, já foi isolado causando criptococose em pacientes com SIDA⁽²⁵⁾. Outros relatos evidenciam as espécies *Cryptococcus albidus* e *C. laurentii* como responsáveis por cerca de 80% dos casos de criptococose não-*neoformans* e não-*gattii*, sendo o *C. albidus* capaz, também, de provocar fungemia em pacientes com SIDA e em neutropênicos, bem como processos pulmonares e meningite^(25, 27). O meio CGB não tem sido utilizado para identificar outras espécies de *Cryptococcus* não-*gattii* e não-*neoformans*. No entanto, Bauters et al.(2001)⁽²⁷⁾ verificaram que o *C. laurentii* pode crescer na presença de L-canavanina e glicina.

O aumento da população de pombos ocorre devido a condições ideais de abrigo e alimentação. Para sua diminuição são necessárias barreiras físicas em locais propícios para construir seus ninhos, bem como

procedimentos rotineiros de limpeza e desinfecção de locais onde há acúmulo de suas excretas. Além disso, dificultar o acesso a alimentação através do controle de lixo ou outras fontes⁽¹⁴⁾.

O pombo doméstico, ao contrário de outras aves, não retira seu material fecal do ninho, permitindo o acúmulo de grande quantidade de substrato tendo como consequência a manutenção das formas fúngicas presentes no ambiente local⁽²⁸⁻²⁹⁾. Os elementos fúngicos infectantes do fungo *C. neoformans* podem permanecer viáveis nas excretas secas de pombos, por até dois anos⁽²⁸⁻³⁰⁾. Sendo assim, o acúmulo de grande quantidade de excretas de pombos pode aumentar a proliferação do *C. neoformans* no local.

Uma das limitações encontradas neste estudo foi a dificuldade em garantir a origem das excretas, mesmo com a presença de pombos nos locais coletados, outras aves também circulam nestas áreas. Além disso, a identificação das espécies pelo seqüenciamento não confirmou a identificação pelo processo laboratorial.

CONCLUSÕES

A prevalência deste fungo é elevada em Hospitais em Porto Alegre, principalmente na estação do inverno (12,5%). O entendimento do risco biológico desses potenciais agentes patogênicos do ambiente é de extrema importância para o controle epidemiológico

da criptococose. Este fato, unido ao estreito contato com indivíduos que circulam por hospitais, indica um potencial risco de saúde pública, principalmente para os pacientes imunodeprimidos.

No presente estudo, foi possível verificar a presença do *C. gattii*, nas fezes de pombos, compartilhando com o nicho do *C. neoformans*.

Apesar das amostras seqüenciadas não confirmarem as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*, as provas fenotípicas laboratoriais indicaram a presença de *Cryptococcus* spp. e de ambas as espécies, estabelecendo assim o real risco de infecção dos pacientes que circulam nos hospitais. Mesmo assim ainda são necessários mais estudos, para confirmar estes achados.

REFERÊNCIAS

- Lin X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(4):401-16.
- de F L Fernandes O1, Passos XS, Souza LK, Miranda AT, Cerqueira CH, Silva Mdo R. In vitro susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiania, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2003; 98(6):839-41.
- Ohkusu M, Tangonan N, Takeo K, Kishida E, Ohkubo M, Aoki Set al. Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop. São Paulo* 2002; 44(6):299-302.
- Filiú WFO, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lazera M. Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35(6):591-595.
- Rosario I, Acosta B, Colom MF. Pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus* spp. *Rev Iberoam Micol.* 2008; 25:S13-18.
- Ma H, May RC. Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol* 2009; 67:131-90.
- Igreja RP, Lazera MS, Wanke B, Galhardo MC, Kidd SE, Meyer W. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients of the Brazilian city. Rio de Janeiro. *Med Mycol* 2004;42:229-38.
- Oliveira-Netto IC, et al. Meio século de criptococose no Brasil: revisão de 308 casos (1941-1992). *Ambito Hospitalar (Infectologia).* 1993;7:5-16.
- Rozenbaum R, Golçalves AJ. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. *Clin Infect Dis* 1994;18(3):369-80.
- Cavalcanti MAS. Criptococose e seu Agente no Meio Norte, Estados do Piauí e Maranhão, Brasil. Tese. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro e Universidade Federal do Piauí, Teresina. Rio de Janeiro, 1995.
- Severo LC. Criptococose: duas doenças? Tese. Fundação Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre; Porto Alegre, 1993.
- Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (COBEA). *Princípios Éticos.* São Paulo. Disponível em: URL: http://www.cobea.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=102&Itemid=119 Acesso: 21 jan.2013.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press. Washington, 1996. Disponível em: URL: http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=5140. Acesso: 21 jan.2013.
- Faria RO, Nascente Pda S, Meinerz AR, Cleff MB, Antunes Tde A, Silveira Eda S et al. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon excrement in the city of Pelotas, State of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med. Trop* 2010; 43:198-200.
- Macêdo RCL, Santos MJS, Oliveira AM, Oliveira MRF, Lopes SP, Ferreira F et al. *Cryptococcus neoformans* em ambientes públicos na cidade do Rio de Janeiro. Dados preliminares. In: Anais do III Congresso Brasileiro de Micologia. Águas de Lindóia, SP; 2001.
- Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Med Mycol* 2000; 38(5):385-90.
- Rezende DG, Siqueira AM. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de aves na cidade de Alfenas, MG. In: Anais do III Congresso Brasileiro de Micologia; Águas de Lindóia, SP; 2001.
- Soares MC, Paula CR, Dias AL, Caseiro MM, Costa SO. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brasil. *Rev Inst Med Trop* 2005; 47(1):31-6.
- Baroni FA. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos localizadas em torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro: fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos. Tese. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; São Paulo, 2001.
- Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Silva-Vergara ML, Pedrosa AL. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. *Fungal Biol.* 2010; 114:438-45.
- Rustan ME, Rubinstein HR, Siciliano C, Masih DT. Possibility of in-hospital infection by *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1992 Sep-Oct;34(5):383-7.
- Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol.* 1990 Jul;28(7):1642-4.
- Leal AL, Faganello J, Bassanesi MC, Vainstein MH. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. *Med Mycol* 2008; 46:377-83.

24. Klein KR, Hall L, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. *J Clin Microbiol* 2009 ;47:3669-72.
25. Khawcharoeporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-neoformans Cryptococcal Infections: a Systematic Review. *Infection* 2007;35:51-8.
26. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:515–548.
27. Bauters TGM, Swinne D, Boekhout T, Noens L, Nelis HJ. Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromized patient. *Mycopathologia* 2001;153:133-5.
28. Caicedo LD, Alvarez MI, Llanos CE, Molina D. *Cryptococcus neoformans* em excretas de palomas del perímetro urbano de Cali. *Colomb Med* 1996; 27:106-9.
29. Emmons CW. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Trop Med Hyg* 1955; 62:227-32.
30. Reolon A, Perez LRR, Mezzari A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de porto Alegre, Rio Grande do Sul. *J Bras Patol Med Lab*, 2004;40(5):293-8.

Correspondência:

Adelina Mezzari

Laboratório de Parasitologia e Micologia, sala 205
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Rua Sarmento Leite, 245, CEP 90050-170, Porto Alegre, Brasil.

E-mail: mezzari@ufcspa.edu.br