

**UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINARIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

DISSERTAÇÃO

**BIOTIPAGEM, SOROGRUPAGEM E PRODUÇÃO DE PROTEASE E
FOSFOLIPASE POR *Cryptococcus neoformans* ISOLADOS DE CÃES E
GATOS NOS MUNICÍPIOS DE RIO DE JANEIRO-RJ E SÃO PAULO-SP**

FELIPE LOPES CAMPOS

2006



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

**BIOTIPAGEM, SOROGRUPAGEM E PRODUÇÃO DE PROTEASE E
FOSFOLIPASE POR *Cryptococcus neoformans* ISOLADOS DE CÃES E
GATOS NOS MUNICÍPIOS DE RIO DE JANEIRO-RJ E SÃO PAULO-SP**

FELIPE LOPES CAMPOS

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

**Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau
em **Magister Scientiae** em
Microbiologia Veterinária.**

**Seropédica, RJ
Março, 2006**

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

FELIPE LOPES CAMPOS

Dissertação submetida ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária,
como requisito parcial para obtenção do grau de **Magister Scientiae**, em
Microbiologia Veterinária.

Francisco de Assis Baroni. (Dr.) UFRRJ
(Orientador)

Cíntia de Moraes Borba. (Dr.) FIOCRUZ

Vera Lúcia Teixeira de Jesus. (Dr.) UFRRJ
(Suplente)

A Deus

Inteligência suprema causa primária de todas as coisas. (Livro dos Espíritos, p. 0001)

A Deus ofereço estas linhas, estas páginas...Ainda que tão singelas sejam minha inteligência e sensibilidade para compreendê-Lo. Ofereço a Ele, porque um dia na magnífica poesia de sua criação, encontrou um espaço para compor os ingredientes, para que aqui eu estivesse. Ofereço, dedico, esta obra, porque em todos os momentos de minha(s) vida(s), Ele nunca deixou de olhar para baixo, aquecendo meu Espírito de tudo que lhe era importante...colorindo todos os “sins e nãoos”, iluminando todas as portas que precisava abrir.

Aos meus Pais,

Amaury Fialho Campos

Marina Elizabeth Souza Lopes

Impossível seria chegar a qualquer parte sem eles. Grandes artistas no palco da existência, oferecendo, dos primeiros aos atuais passos o que de mais precioso pode alguém receber...possuir: "O Amor". Ensinaram-me a sonhar e acreditar poder realizar os sonhos, a lutar com coragem e determinação extraindo o muito de onde aparentemente não havia nada e o tudo de onde parecia muito pouco. A eles, também dedico esta obra, na qual são co-responsáveis pela existência, pois pintaram na minha alma o que me faz estar aqui, sendo os maiores artesãos do meu crescimento psicológico e moral.

Ao meu irmão

Rafael Lopes Campos

Que sempre preencheu meu coração de alegria e amor.

A Valéria Cristina da Rocha,

Um dia, Deus fez com que surgisse em meu caminho alguém com traços muito particulares, passos tímidos quase escondidos, mas com um olhar que soube encontrar o meu entre a multidão que passava. A totalidade de seu Ser encheu minha vida de entusiasmo e amor, conduzindo meus passos a descobrir vales profundos em minha emoção. Com ela a vida tornou-se alegria, os sonhos tornaram-se cotidiano, os versos tornaram-se, todos, o seu nome ... e por isso dedico a ela, não apenas esta obra, mas todos os dias de minhas existência.

A

Clarissa Plácido

Joaquim Tavares Lobo Jr

Patrícia de Amorim

Roberta Anjos de Souza

A essas grandes personalidades, ofereço este trabalho, cumprindo uma promessa, feita nos momentos pulsantes de nosso segundo grau, em que as agendas eram documentos importantíssimos e a Lua nem era tão longe. Talvez não se lembrem, quando prometi que dedicaria a eles minha primeira obra. Não imaginava que seria uma tese, mas aqui estamos, eu e eles, mais uma vez juntos, relembando os doces momentos em que percorríamos os mesmos caminhos. Ainda que os espaços tenham nos afastado parcialmente, percebemos que esta é a menor das distâncias...A vocês, pelas pessoas imprescindíveis que foram em minha vida, pelos grandes seres que são, por nunca terem saído da minha lembrança e das minhas preces.

“amigo é coisa pra se guardar ...do lado esquerdo do peito...dentro do coração...”(Milton Nascimento)

Ao Amigo e orientador

Francisco de Assis Baroni

Ao querido professor e Amigo, dedico estas palavras, pelo brilhantismo com que conduziu todos os momentos de orientação, apresentando-se atencioso, ético, criterioso e amigo. Ao longo destes dois anos muitas foram as expectativas em prol do trabalho a realizar, o que gerou resultados que compõem, hoje, nossa tese. Apesar disso, algo ainda maior pôde ser conquistado, a troca de experiências, histórias e até risadas... que levaram dia-a-dia, a transformação dessa grande figura em um modelo. Desta forma, enalteço a imagem de um Orientador irretocável e de um amigo Inesquecível.

AGRADECIMENTOS

Toda história é composta por inúmeros pedaços... são pedaços importantes, sem os quais as etapas vivenciadas perderiam o sentido. Por isso, neste momento reservo meus agradecimentos a pessoas que foram muito importantes para a confecção deste trabalho, colaborando de forma direta ou indireta e sendo por isso essenciais.

Ao Prof. Sérgio Gaspar de Campos, que primeiro apresentou a Microbiologia aos meus olhos, orientando-me a ser um profissional criterioso e atento.

Aos pesquisadores e Médicos Veterinários do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman,: Marlon Vicente da Silva, chefe da seção de diagnóstico de Raiva e Beatriz Cristina Pereira dos Santos chefe do setor de testes biológicos, pela generosa atenção dispensada e dedicada no fornecimento das amostras para o nosso trabalho.

*Ao ICB-USP que generosamente cedeu, os isolados de *Cryptococcus spp* para nosso trabalho.*

Às pesquisadoras e professoras: Cíntia de Moraes Borba e Vera Lúcia Teixeira de Jesus, , que gentilmente aceitaram compor a banca avaliadora deste trabalho, contribuindo com o seu saber para o aprimoramento final da obra.

Aos amigos do Centro Espírita Amor à Verdade, Elaine Carvalho e André Diele, sempre presentes, oferecendo algo muito importante nesta etapa, sua amizade em todos os momentos. E a todos os jovens da mocidade, estimuladores de minha vontade em progredir.

Aos meus alunos que estimularam minha paixão pela docência, transformando o mestrado em um grande veículo para essa próxima conquista.

A todos os professores que passaram por minha vida, ensinando-me parte do seu saber, desde as vogais mais simples no ensino primário até as técnicas mais sofisticadas na universidade.

Aos animais, que contribuem silenciosamente para o progresso científico da humanidade, oferecendo seus corpos e vidas em prol de responder as interrogações que povoam nossos livros. A eles todo meu respeito, admiração e dedicação. Especialmente a Domênica, Pitanga, Panchito, Mercedes, Jr. Queridos animais de estimação.

SUMARIO

Introdução.....	1
1. Revisão de Literatura.....	2
1.1 Histórico.....	2
1.2 Taxonomia.....	2
1.3 Ecologia.....	3
1.4 Epidemiologia.....	4
1.5 Patogenia.....	5
1.6 Fatores de Virulência.....	7
2. Material e Métodos.....	9
2.1 Obtenção das amostras.....	9
2.1.1 Local de coleta.....	9
2.1.2 Tipo de amostra.....	9
2.2 Processamento das amostras.....	10
2.3 Leitura dos solados.....	10
2.4 Identificação de <i>Cryptococcus neoformans</i>	11
2.4.1 Identificação de gênero e espécie.....	11
2.4.2 Sorogrupagem.....	11
2.4.3 Biotipagem “Killer”.....	11
2.5 Fatores de Virulência.....	13
2.5.1 Produção de Protease.....	13
2.5.2 Produção de Fosfolipase.....	13
3. Resultados e discussão.....	15
4. Conclusões.....	27
5 Referencias Bibliográficas.....	29
6 Anexos	

ÍNDICE DE TABELAS

1	Relação de sexo e idade dos cães e gatos destinados ao Instituto Jorge Vaitsman e utilizados no trabalho.....	10
2	Padrões de sensibilidade frente a toxinas “killer”.....	12
3	Atividade enzimática de protease e fosfolipase padronizadas para <i>C. neoformans</i>	14
4	Resultados do isolamento de <i>C. neoformans</i> de cães e gatos oriundos do IMJV / Rio de Janeiro.....	16
5	Relação de cepas isoladas, espécie de <i>Cryptococcus</i> spp, espécie animal da qual foi isolada	19
6	Resultado dos testes de produção de protease por cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i>	24
7	Resultado dos testes de produção de fosfolipase.....	25

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Isolamento de <i>Cryptococcus neoformans</i> , demonstrando colônias de cor marrom em meio contendo dopamina. Cepa 476.....	18
Figura 2: Microscopia óptica de <i>C. neoformans</i> utilizando tinta da China. Aumento de 400X	18
Figura 3: Microscopia óptica de <i>C. neoformans</i> utilizando lactofenol com azul de Algodão. Aumento de 400X	19
Figura 4: Teste de produção de urease . Cepa ICB 253, demonstrando reação positiva com coloração rosa.....	20
Figura 5: Sorogrupagem em meio CGB – cepas pertencentes a variedade <i>gattii</i> . Cepas 476, MR1 e LLPA 010 apresentando reação positiva e mudança de cor para azul.....	21
Figura 6: Sorogrupagem em meio CGB – cepas pertencentes a variedade <i>neoformans</i> . Cepas 195, apresentando reação negativa e meio sem alteração de cor.....	21
Figura 7: Comparação de coloração em meio CGB de cepas pertencentes as variedades <i>gattii</i> e <i>neoformans</i> . Cepas 476 e 195 respectivamente.....	22
Figura 8: Biotipagem “Killer”. Cepa MR1, demonstrando sensibilidade compatível com o biotipo VIII.....	22

RESUMO

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

Objetivando o isolamento da levedura *Cryptococcus neoformans* do sistema nervoso central de cães e gatos no Município do Rio de Janeiro, procedeu-se às coletas periódicas, no período de abril de 2004 a julho de 2005, de amostras de cérebro, no Laboratório de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman no bairro da Mangueira, Rio de Janeiro. Das 201 amostras obteve-se um total de quatro positivas para o gênero; sendo uma de *Cryptococcus laurentii* e três de *C. neoformans*, das quais duas revelaram-se pertencentes à variedade *neoformans* e uma à variedade *gattii*. Secundariamente, confrontamos estas com amostras obtidas junto ao ICB-USP, previamente isoladas e identificadas, quanto ao potencial de virulência espelhado pela produção de fosfolipase e de protease. A biotipagem “Killer” empregada em todos os isolados demonstrou uma predominância do biotipo II para a variedade *neoformans* e biotipo VIII para a variedade *gattii*. Todos os isolados apresentaram-se produtores de protease e de fosfolipase, em diferentes graus.

Palavras chave: *Cryptococcus neoformans*, protease, fosfolipase

ABSTRACT

CAMPOS, Felipe Lopes. **Biotyping, serogrouping, production of protease and fosfolipase by *Cryptococcus neoformans* strains isolates from dogs and cats in Rio de Janeiro City and São Paulo City.** Seropédica: UFRRJ, 2006.45p.(Dissertation, Master Scientiae in Veterinary Microbiology)

The aim of this survey was the isolation of the *Cryptococcus neoformans* yeast from cats and dogs central nervous system in Rio de Janeiro City. Periodic collections were made from brain samples from April 2004 to July 2005 at the rabies diagnosis laboratory in the Jorge Vaitsman Veterinary Medicine Municipal Institute in Mangueira, RJ. According to the results, of the 201 clinical samples, we found four positives samples; one of these was positive for *C. laurentii*, three were positive for *Cryptococcus neoformans*; of which two were *neoformans* variety and one was *gattii* variety. Secondarily we compared with strains from the ICB-USP, previously isolated and identified as for urease and fenol-oxidase production in qualitative character, in the same way that the potential of virulence demonstrated to fosfolipase and protease production. “Killer” biotyping used in all isolates showed a predominance of biotype II to *neoformans* variety and biotype VIII to *gattii* variety. All isolates showed protease and fosfolipase production in varied degrees.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, protease, fosfolipase

INTRODUÇÃO

A criptococose é uma micose rara, cosmopolita, com comportamento oportunista, causado por uma levedura encapsulada, *Cryptococcus neoformans*. A epidemia da imunodeficiência adquirida repercutiu em aumento significativo da micose. A patologia é transmitida por via aerógena, iniciando-se por infecção pulmonar, podendo ocorrer em forma sintomática ou assintomática, apresentando evolução aguda ou crônica. Após a criptococose pulmonar primária, a levedura pode entrar na corrente sanguínea para disseminar-se para outros tecidos como músculos, pele, mucosas, apresentando afinidade pelo sistema nervoso central. Tais características podem ser observadas tanto na clínica humana quanto animal, com sintomatologias respiratórias sem características específicas da patologia, podendo ocorrer, também, lesões dermatológicas. Em seu estado mais grave, ocorre o envolvimento neurológico, que direciona o diagnóstico, principalmente, para as meningoencefalites de etiologia viral.

A mortalidade promovida pela doença criptocócica é elevada, mesmo com o tratamento disponível, e nos casos de cura, são frequentes as seqüelas neurológicas. A associação com imunossupressão, evidenciando o caráter oportunista, existe em relação ao comprometimento da imunidade celular, sendo comum nos linfomas, leucemias crônicas, sarcoidose, uso de corticosteróides, transplantes de órgãos e mais recentemente nos casos de AIDS. Em veterinária, são muito comuns os casos de gatos com positividade para o vírus da imunodeficiência felina, panleucopenia felina, animais não vacinados, além de ampla utilização da corticoterapia, que são fatores predisponentes à infecção criptocócica.

Em microbiologia veterinária, há muita carência de relatos. Muitas das características do *Cryptococcus neoformans* precisam ser avaliadas, já que a maior parte dos trabalhos encontrados sobre esta micose em cães e gatos retratam apenas o aspecto clínico com diagnóstico básico, utilizando como recurso a citologia ou histopatologia, sem no entanto buscar o isolamento do agente.

O trabalho busca mais informações sobre a ocorrência de *Cryptococcus neoformans* no sistema nervoso central de cães e gatos, ocupando desta forma, a posição de diagnóstico diferencial de patologias nervosas, nas quais entre as etiologias possíveis encontra-se a infecção pelo vírus rábico. A classificação em sorotipos e sorogrupos possibilita mais um suporte para os dados clínico-patológicos, já que as variedades podem apresentar comportamentos distintos, como predileção por habitat, e até mesmo a expressão do grau de virulência. Epidemiologicamente podemos ter noção de incidência entre os dois municípios, relacionando os resultados obtidos com a atual distribuição da criptococose.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Histórico

A criptococose é uma micose rara, profunda, de caráter oportunista que pode acometer aos homens e aos animais. Os primeiros dados registrados datam de 1894 quando Francesco Sanfelice, apud Mitchell e Perfect, (1995), isolou uma levedura capsulada do suco de pêssago. Trabalhando com experimentação animal Sanfelice observou o caráter patogênico da levedura, denominando-a em 1895 *Saccaromyces neoformans* (Drouhet, 1997).

O termo *Cryptococcus* foi criado em 1833 por Kutzing, apud Drouhet (1997). Sua derivação tem origem na palavra grega “Kryptos”, que se relaciona a “secreto”, “misterioso”, para designar leveduras não produtoras de endosporos .

Otto Busse (1894) apud Mitchell e Perfect (1995) observou na tíbia humana, a presença de uma levedura capsulada. A partir desta obsevação, denominou a doença de *Saccharomycosis hominis*. Estudando o mesmo caso, Buschke (1894) apud Drouhet (1997), através de exame histopatológico, conclui que o agente era um coccídio.

Scotdard e Cutler (1916) apud Casadevall e Perfect, (1998), observaram que tecidos parasitados eram rodeados por áreas claras, considerando as mesmas como lise tecidual. Por este motivo, denominaram a levedura como *Torula histolytica*. Freeman (1831), apud Casadevall e Perfect (1998), descreve que os espaços visualizados resultavam da contração sofrida pela cápsula durante a fixação nos tecidos.

A classificação das leveduras, de acordo com o seu padrão de assimilação, fermentação, morfologia colonial e sorologia, proporcionou a identificação das mesmas em 1935 por Rhoda Bendan, apud Drouhet, (1997). Desta forma denominaram-se dois grupos: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus hominis*. Finalmente, o gênero *Cryptococcus* e a espécie *Cryptococcus neoformans*, foram considerados aceites segundo o proposto por Fell et al. (1989).

1.2 Taxonomia

Taxonomicamente o *Cryptococcus neoformans* é classificado segundo o estado teleomorfo (Kurtzman e Fell, 1998):

Reino: Fungi

Divisão: Basidiomycota

Ordem: Filobasidiales

Família: Filobasidiaceae

Gênero: *Filobasidiella*

Espécie:

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

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

Tendo como correspondentes anamorfos respectivamente:

Cryptococcus neoformans var *neoformans*

Cryptococcus neoformans var *gattii*

A descoberta do estágio sexual teve seu início quando, Shadomy e Utz,(1966) observaram hifas com conexão em grampo, similares às dos basidiomicetos em algumas cepas de *Cryptococcus neoformans*. Com isso Kwon-Chung (1975) propôs a espécie *Filobasidiella neoformans* para acomodar este basidiomiceto. Já Kwon-Chung et al. (1976) demonstraram a existências de duas variedades de *Filobasidiella neoformans*, chegando a conclusão que as cepas podem se reproduzir sexuadamente, tendo neste caso, como característica, a produção de basidiósporos, ainda que seja incerta a patogenicidade destas cepas. A fase sexuada tem sido reproduzida somente *in vitro*, através de cepas compatíveis e em meios especiais com baixo teor de nitrogênio e água (Kwon-Chung et al. 1976).

No estado anamórfico, as variedades são similares, sendo fenotipicamente diferentes entre si no estado teleomórfico. Os basidiósporos da variedade *neoformans* são esféricos, oblongos, elípticos ou cilíndricos, com paredes rugosas, enquanto os da variedade *gattii* são baciliformes e com paredes de aspecto liso (Kreger van Rij, 1984; Ellis e Howard, 1992).

A identificação dos sorotipos de *Cryptococcus neoformans* teve início quando em 1949, Evans, apud Casadevall e Perfect, (1998) pôde constatar a existência dos sorotipos A, B e C. O sorotipo D foi incorporado a esta classificação, por Wilson et al. (1968). Desta forma, foi estabelecida a divisão em duas variedades: a primeira, variedades *neoformans*, com os os sorotipos A e D e a segunda, variedade *gattii*, com os sorotipos B e C.

Franzot et al. (1999) propuseram uma nova classificação, considerando o sorotipo A, como pertencente a uma terceira variedade, denominada *grubii*. Outros autores também consideram a variedade *grubii* em seus trabalhos (Silva et al. 2005; Soares, 2005) Seguindo este raciocínio, *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* representaria, então, apenas o sorotipo D. Esta nova vertente na classificação baseou-se nos caracteres genotípicos dos sorotipos estudados. Estes dados são mencionados por Franzot et al. (1999), que consideram, entretanto, a existência de cinco sorotipos, A, B, C, D, AD, respeitando a classificação anterior e incluindo o sorotipo AD à variedade *neoformans*.

1.3 Ecologia

As excretas de pombos, estão entre as fontes mais conhecidas do *Cryptococcus neoformans* como relatam (Swinne-Desgain, 1975; Levitz, 1991; Passoni, 1999; Baroni, 2001; Reolon et al. 2004; Campos et al. 2005). São implicados ainda, como fontes importantes, as excretas de outras aves, como canários, papagaios e uma variedade de outras espécies (Swinne-Desgain, 1975; Bawens et al. 1986; Levitz, 1991 Vieira et al. 2004).

Swine-Desgain (1975) isolou *Cryptococcus neoformans* das excretas e do trato digestivo de pombos. Paralelamente, obteve êxito ao isolar o mesmo agente do ambiente onde os pombos habitavam, como água de bebedouro e gaiolas.

A viabilidade do *Cryptococcus neoformans*, em excretas dessecados, pode chegar a dois anos, podendo crescer em altas densidades (Litman & Borok, 1968). Nas excretas de pombos, a levedura encontra fontes de creatinina, uréia, ácido úrico, purinas e xantinas, que são facilmente assimiláveis, sendo esta característica, o resultado de uma provável adaptação bioquímica (Levitz, 1991).

Como mencionam Silva et al. (2005) e Soares et al. (2005) a levedura não cresce em temperaturas acima de 40°C, de forma que excretas sob luz solar direta tem menos

possibilidades de servir como habitat para o fungo (Ellis e Pfeiffer, 1990). Estes dados concordam com Stokes (1971) que relata o crescimento máximo de leveduras, com raras exceções, no intervalo máximo de temperatura entre 30°C e 40°C. Talvez pelo binômio: “Temperatura – Crescimento”, tenhamos uma explicação para a rara ocorrência de criptococose em pombos, já que estes possuem temperatura corpórea entre 40°C e 42°C, capaz de impedir seu crescimento (Pereira e Coutinho, 2003)

O mecanismo de contaminação das excretas ainda não é claro. Foi sugerido que a variedade *neoformans* tem como habitat natural plantas específicas, que os pombos podem utilizar como alimentos. Ocorreria, desta forma, um mecanismo de dispersão sazonal do teleomórfico *Filobasidiella neoformans* var *neoformans* (Ellis e Pfeiffer, 1990).

Silva e Paula, (1963) encontraram *Cryptococcus neoformans* em ninhos de pombos em Salvador, na Bahia enquanto Baroni (2001) isolou o mesmo agente, de ninho de pombo e excretas presentes em torres de igreja no Rio de Janeiro. Montenegro e Paula (2000) trabalharam com excretas e materiais de eucalipto na cidade de São Paulo e isolaram a variedade *neoformans* e a variedade *gattii*. No Rio de Janeiro a variedade *gattii* já havia sido isolada por Lazera et al. (1995), a partir de solo contaminado com fezes de morcego. Reolon et al (2004) em trabalho realizado em Porto Alegre - RS, encontraram 100% de positividade para *Cryptococcus neoformans*, a partir de excretas de pombos.

As excretas de pombos podem ser relacionadas a presença de *Cryptococcus laurentii*, como demonstrado por Bernardo et al. (2001) ao encontrarem 40% de positividade para esta espécie, em trabalho que buscava avaliar fontes urbanas de *Cryptococcus* spp em Lisboa-Portugal. Da mesma forma, Vieira et al. (2004) e Carvalho et al. (2004), isolaram *C. laurentii* ao trabalharem com excretas de pássaros cativos e pombos em Alfenas - MG. Carmo-Souza (1971) menciona a presença de *C. laurentii* em solo trabalhado com técnicas de enriquecimento e em água do mar.

Por seu caráter cosmopolita, encontramos relatos da presença de *Cryptococcus neoformans*, desde poeira doméstica (Swine-Desgain et al. 1991; Lazera, 1998), solo (Rubistein et al. 1989), ocos de árvore (Lazera, 1995) até achados clínico-patológicos relacionados principalmente a animais e a homens imunocomprometidos (Farias Filho et al. 2004; Lemos et al. 2004; Martins et al. 2004; Stephen, 2002).

Um dos aspectos relacionados a ecologia de *Cryptococcus neoformans* é a produção de micocinas “Killer”, que são substâncias capazes de impedir o crescimento de outros fungos. Segundo Morace et al., (1984) este é um fenômeno bem difundido entre as leveduras, dependente da temperatura, pH e do substrato. Boekhout e Scorzetti, (1997) estudando 122 cepas clínicas e saprófitas da variedade *neoformans* e 32 cepas da variedade *gattii*, distinguiram 10 biotipos segundo a sensibilidade a toxinas “Killer” para *Cryptococcus neoformans*.

1.4 Epidemiologia

O *Cryptococcus neoformans* é encontrado em todo o mundo, em diversos tipos de solos e em tecidos, secreções e excreções de animais e do próprio homem (Batista e Silva, 1997). Seu caráter oportunista pode ser observado por sua incidência nos casos de imunodepressão (Fernandes et al., 1999; Hamilton, 2002).

Há uma forte associação entre a incidência de criptococose em portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (Fernandes et al, 1999; Chakrabarti et al, 2000; Fernandes, 2001). Segundo Garcia-Hermoso et al. (1999) pode ocorrer no organismo, uma forma

latente culminado em infecção, devido a alteração do sistema imunológico podendo-se fazer uma ponte com as informações de Pappalardo e Melhem, (2003), quando mencionam que a associação da criptococose em casos de AIDS está geralmente relacionada com uma resposta deficitária da imunidade celular. Sendo este o principal mecanismo da imunidade adaptativa contra infecções fúngicas, como descrevem Darze et al., (2000) e Abbas e Lichtman, (2005), há um favorecimento à infecção pelo *Cryptococcus neoformans*, principalmente se o grau de virulência for elevado.

Sorrel et al, (1999), observaram prevalência no sexo masculino dos casos de criptococose, sendo o mesmo fato relatado por Fernandes et al., (1999) e Pappalardo & Melhem, (2003) que, ainda mencionam a idade adulta como a de maior risco. Segundo Correa et al., (1998), *Cryptococcus neoformans* tem sido descrito em pacientes com todas as idades. Darzé et al. (2000), analisaram casos de criptococose em pacientes com idades variadas, no período de 1972 a 1996, e perceberam que um terço ocorreu em pacientes com idade inferior a 15 anos.

Rustan et al. (1992), isolaram *Cryptococcus neoformans* em amostras colhidas na periferia de um hospital de doenças infecciosas na cidade de Córdoba. Campos et al. (2005) isolaram o mesmo agente ao trabalhar com amostras obtidas na rede pública de saúde no município do Rio de Janeiro.

A presença do agente no ar, não significa que estes atinjam ou causem infecção alveolar. Do mesmo modo as lesões pulmonares em pacientes com criptococose disseminada, não se relacionam, necessariamente com uma infecção por via inalatória (Casadevall e Perfect, 1998), embora existam cepas clínicas geneticamente relacionadas às cepas isoladas de excretas, o que sustenta a idéia de infecção por vias aéreas.

Vidotto et al., (2005) e Ganedren et al., (2006) ao realizarem estudos sobre atividade de enzimas extracelulares, relacionaram amostras ambientais como causadoras de criptococose pulmonar sugerindo que a via inalatória é possível.

Rozebaum et al. (1992) estudaram isolados de casos de criptococose disseminada em portadores de AIDS, encontrando tanto a variedade *gattii* quanto a *neoformans*. Das 66 amostras utilizadas no trabalho, apenas uma foi classificada como pertencente a variedade *gattii* enquanto as 65 restantes pertenciam à variedade *neoformans*. Rozebaum e Gonçalves (1994) analisando 171 pacientes brasileiros também encontraram a variedade *neoformans* na maioria dos portadores de AIDS. Sant'Anna et al. (1999) trabalharam com amostras de *Cryptococcus neoformans*, isolados de líquido de pacientes com neurocriptococose no Estado de São Paulo. Das 337 amostras, 90,2% eram de pacientes com AIDS e apenas 2,97% eram pertencentes a variedade *gattii*. Em pacientes HIV negativos, Paula et al. (1998) encontraram a variedade *neoformans* em 62,5% das amostras e a variedade *gattii* em 32,5%.

Neves et al. (2004) ao estudarem novas fontes para a variedade *gattii*, em Boa Vista – RR, obtiveram resultados que demonstram que substratos relacionados à variedade *neoformans* também podem ser relacionados à variedade *gattii*. Entre as fontes pesquisadas temos poeira domiciliar, areia contaminada com excretas de galinhas, além de madeira em decomposição e troncos de palmeiras.

1.5 Patogenia

A penetração do agente ocorre pela via respiratória como nos mostram Buchanan e Murphy, (1998). Há evidências, experimentalmente comprovadas, por Lourenço et al.

(2004), que logo após a penetração por via aérea, ocorre presença intra-brônquica do fungo, focos pneumônicos e intensa reação neutrofílica, seguidos de invasão do epitélio brônquico e do parênquima pulmonar, com marcante ação de macrófagos, presença de atelectasia e empiema. Com a infecção e multiplicação ocorre o desenvolvimento capsular, que encobre os antígenos da levedura e impede sua apresentação aos macrófagos, impedindo sua destruição. A cápsula é, portanto, um importante fator de virulência (Pereira e Coutinho, 2003)

A levedura apresenta tropismo pelo sistema nervoso central (SNC) promovendo a colonização do mesmo (Correa et al, 1999; Fernandes et al, 1999; Pappalardo e Melhem, 2003; Macedo et al., 2005; Silva et al., 2006), fazendo a invasão por via hematogênica ou por extensão direta da cavidade nasal (Pereira e Coutinho, 2003; Lazera, 2004). Os sintomas neurológicos estarão presentes de acordo com o envolvimento das meninges ou aumento da pressão intracraniana (Crissey et al, 1995). Desta forma provoca quadro sintomático severo (Sá et al, 2004).

A criptococose pode afetar diferentes espécies animais. Sanfelice, em 1894, apud Casadevall e Perfect,(1998), isolou a levedura de linfonodo bovino, sendo este considerado primeiro isolamento de um animal. Posteriormente Costa et al. (1993) isolaram o agente de rebanhos leiteiros com mastite clínica e subclínica. Macedo et al (2005) diagnosticaram um caso de criptococose cerebral em bovino na Paraíba.

Em ovinos há os relatos recentes de Lemos et al. (2004) e Pereira et al. (2005), embora Laws & Simmons (1996) já tenham relatado nesta espécie animal a ocorrência da levedura.

Em cavalos há descrição de Watt (1970). Segundo Chapman, (1990), a criptococose em caprinos apresenta sinais variados, com lesões nasais, traqueais e pulmonares

Em cães, o sistema nervoso pode ser afetado (Coetzer et al., 1976; Tiches et al., 1998; Lavelly e Lipsitz, 2005), promovendo sinais neurológicos variáveis de acordo com a localização das lesões, que podem ocorrer nas meninges, no encéfalo, na medula ou nos nervos periféricos, como relatam Pereira e Coutinho, (2003). Os sinais clínicos mais comuns são ataxia, depressão, paresia, convulsão, andar em círculo, perda de olfato e cegueira. Netto et al., (2005) encontraram em um cão com criptococose, massa na região frontal, com comprometimento do olho esquerdo, secreção purulenta e hiperemia conjuntival além de obstrução da cavidade nasal, dispnéia e sinais de desidratação.

Beheregaray et al. (2005), isolaram *Cryptococcus neoformans* em um cão apresentando comprometimento de linfonodos, pele, olhos e glândulas mandibulares. Outro caso clínico com envolvimento ganglionar foi demonstrado por Acosta et al (1999) que diagnosticaram criptococose em um cão com linfadenite, alterações hematológicas marcadas por leucocitose com desvio à esquerda, vômito, diarreia, anorexia e debilidade. O animal apresentou recidiva após o tratamento preconizado, sendo encontrada a levedura no SNC. Newman et al. (2003) estudaram um caso de pielonefrite em um cão, concomitante com manifestações neurológicas caracterizadas pela presença de leveduras no cérebro. Kerwin et al. (1998), encontraram em um cão pinsher, lesões compressivas ao nível de vértebras cervicais, chegando ao diagnóstico de *Cryptococcus neoformans* através de sorologia. Neste mesmo animal, não foi percebido pelos autores envolvimento de outros sistemas.

Nos gatos foi descrita pela primeira vez por Chagas et al. (1971), com quadro clínico de espirros e lacrimejamento concomitante com surgimento de pequeno caroço na

região frontal, sem demais manifestações clínico-patológicas. É para estes animais considerada a micose sistêmica mais comum, não se verificando predileção por sexo, raça ou idade. O *Cryptococcus neoformans* pode afetar os diferentes órgãos e tecidos, como o trato respiratório, pele, o SNC e os olhos (Garcia e Blanco, 1999; Pereira e Coutinho, 2003). A cavidade nasal e os seios nasais são os mais afetados, com a formação de pólipos ou massa firmes dando o aspecto de “nariz de palhaço” (Farias Filho et al, 2004; Grecco e Moreno, 2003; Pinto-Filho et al., 2004; Scott et al., 1995;)

1.6 Fatores de virulência

Diversos fatores de virulência têm sido implicados na patogenia, dentre os quais, cita-se a termotolerância a 37° C, síntese de melanina, a presença de cápsula, a produção de exoenzimas. O componente polissacáride capsular atua inibindo a fagocitose, consome fatores do complemento, absorve e neutraliza opsoninas e outros anticorpos protetores, promovendo ainda, inibição da quimiotaxia de neutrófilos e produção de anticorpos (Fonseca et al., 2004). O polissacarídeo capsular é um importante fator de virulência (Hamilton, 2002) e contém predominantemente, glucuroxilomanana, sendo responsável pela diferenciação antigênica dos sorotipos A, B, C, D e AD como relata Nishikawa et al. (2004). O pigmento melanínico atua como antioxidante e antifagocítico, protegendo a célula contra estresse físico, raios UV, degradação enzimática e ação de agentes químicos diversos bem como antimicrobianos (Hamilton, 2002; Silveira et al. 2004).

Vidoto et al, 1996, verificaram a produção e fosfolipase em 22 cepas de *Cryptococcus neoformans* com um Pz (Atividade proteolítica enzimática) variando de 0,271 a 0,949, relacionando a produção com o tamanho das cápsulas das cepas. Chen et al. (1997), também identificaram a atividade de fosfolipase extracelular, indentificando-a em fosfolipase B, lisofosfolipase e uma lisofosfolipase-transacilase.

O tamanho da cápsula e a habilidade de crescimento a 37°C, parecem ter relação direta com a produção de fosfolipase (Vidoto et al., 1998), podendo enquadrar, como afirmam Santagelo et al., (1999), a maior atividade enzimática entre as temperaturas de 25°C e 40°C.

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

Aoki et al. (1994), ao analisarem oito cepas de *Cryptococcus neoformans* constatarem produção de protease em todas as cepas, percebida pela formação de zona clara proteolítica em torno das colônias cultivadas em meio “Yeast Carbon Base” (YCB) acrescido de 0,1% de soroalbumina bovina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras.....	9
2.1.1 Local de Coleta.....	9
2.2.2 Tipos de Amostras.....	9
2.2 Processamento das amostras.....	10
2.3 Leitura dos isolados.....	10
2.4 Identificação de <i>Cryptococcus neoformans</i>	10
2.4.1 Identificação do Gênero e Espécie.....	10
2.4.2 Sorogrupagem.....	11
2.4.3 Biotipagem “Killer”.....	11
2.4 Fatores de Virulência.....	13
2.5.1 Produção de Protease.....	13
2.5.2 Produção de fosfolipase.....	13

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras

2.1.1 Local de Coleta

A primeira parte do projeto foi desenvolvida junto ao Laboratório de Diagnóstico de Raiva do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman (IMJV) , localizado no bairro Mangureira, no Município do Rio de Janeiro. Nesta etapa, procedeu-se a coletas mensais no período de abril de 2004 a julho de 2005. Os materiais cedidos eram provenientes de sistema nervoso central (SNC) de cães e gatos, englobando cérebro, cerebelo e bulbo, com prévio diagnóstico negativo para raiva no referido laboratório. As amostras, no Instituto, eram submetidas a congelamento em temperatura de -20°C. Por ocasião das coletas, as mesmas eram separadas e transportadas isotermicamente em caixas de isopor, com gelo de gel reaproveitável, capaz de proporcionar um ambiente refrigerado por um tempo mínimo de oito horas. Cada amostra foi acondicionada isoladamente, em recipiente estéril (coletor universal), com tampa de rosca, e identificada com numeração própria do laboratório de origem. As etapas de isolamento e identificação foram realizadas no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ (LLPA-UFRRJ). O referido laboratório já possuía uma cepa de *Cryptococcus neoformans*, isolada de cérebro de cão, identificada pelo código LLPA 010.

Secundariamente, foram obtidas seis amostras de *Cryptococcus neoformans* e uma de *Cryptococcus laurentii* previamente isoladas e mantidas no Laboratório de Leveduras-Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Tais amostras são provenientes de achados clínicos de cães e gatos, e foram gentilmente cedidas para o trabalho.

2.2.2 Tipos de Amostras

Para o presente trabalho utilizamos 201 amostras de SNC, contendo fragmentos de cérebro, cerebelo e bulbo, das quais, 166 eram provenientes de cães e 35 de gatos, de ambos os sexos, com idades entre dois meses e doze anos como demonstrado na tabela 1 . Já as cepas do ICB-USP, totalizaram sete isolados, dos quais duas eram provenientes de cães e cinco de gatos e no momento em que foram disponibilizados estavam mantidos em Sabouraud Dextrose sob óleo mineral.

Tabela 1- Relação de sexo e idade dos cães e gatos destinados ao Instituto Jorge Vaitsman e utilizados no trabalho

Espécie	Sexo	Idade
Canina	M = 76	2 m- 12 a
	F= 93	
Felina	M = 19	2 m- 6 a
	F = 16	

M =macho F= fêmea m= meses a= anos

2.2 Processamento das amostras

Todos os materiais obtidos no IMVJV, foram catalogados em ficha própria contendo os dados da instituição, procedência do material (espécie acometida), dados específicos dos animais como sexo, idade, raça, além de quadro clínico e histórico.

No Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais, as amostras foram mantidas sob refrigeração a temperatura de 8°C até o momento do processamento, freqüentemente realizado no mesmo dia. Os fragmentos de cérebro, cerebelo e bulbo foram macerados em gral e pistilo, sendo reservada parte do material para preparação de lâminas para o exame microscópico direto.

Previamente ao isolamento, o material triturado foi assepticamente colocado no interior de frascos de Erlenmeyer, com salina estéril (200mL/ frasco), acrescida de cloranfenicol na concentração de 200mg/L (Anexo 1), passando por agitação magnética por dez minutos e sedimentação por uma hora (Baroni, 2001). Um pipetador automático calibrado para 1,0 mL e ponteiras descartáveis esterilizadas foram utilizadas para extrair alíquotas deste volume a partir do sobrenadante a ser inoculado. Na superfície dos meios de cultivo utilizados, este volume foi distribuído uniformemente com o auxílio de alças de Drigalski de vidro esterilizadas por autoclavagem.

Este procedimento foi realizado em triplicata, em cabine de segurança biológica, utilizando-se uma placa de Petri com meio Sabouraud dextrose 4% (Anexo 2) e duas placas de Petri contendo meio com dopamina (Anexo 3) ambos os meios de isolamento, acrescidos de cloranfenicol 200 mg/L. A incubação foi feita em estufa de cultura modelo 002 CB-Fanem Ltda® a 32°C.

2.3 Leitura dos isolados

A partir das primeiras 48 horas até 15 dias, realizamos uma seleção das colônias isoladas em meio Sabouraud dextrose e em meio contendo dopamina. As colônias que

apresentaram coloração creme e aspecto mucóide em ágar Sabouraud dextrose, e as colônias de coloração marrom em meio com dopamina foram marcadas como suspeitas. Desta forma foram confeccionadas lâminas com “tinta da China” e com lactofenol, para a microscopia nas objetivas de 10X, 20X e 40X. As colônias dentro deste padrão, que apresentaram células com aspecto compatível com *Cryptococcus neoformans* (redondas, ovais, oblongas com ou sem brotamento, com ou sem cápsula aparente) foram diluídas em solução salina e reisoladas em placas de Petri contendo meio dopamina.

2.4 Identificação de *Cryptococcus neoformans*

(Kreger van-Rij, 1984; Kurtzman e Fell, 1998)

2.4.1 Identificação do Gênero e Espécie

Antes de serem submetidas aos testes, todas as cepas foram repicadas em meio Sabouraud dextrose a 4% e mantidas por 48 horas, para a obtenção de cultura jovem.

Os isolados foram novamente submetidos a prova de produção de fenoloxidase em meio com dopamina, sendo a leitura realizada a partir das primeiras 48 horas. Em seqüência foi realizado o teste de produção de urease em meio Christensen (Difco – Anexo 4) além do perfil de assimilação de açúcares e fontes nitrogenadas (auxanograma). Foi também realizado o teste de fermentação negativa de açúcares (zimograma). Em cada um dos testes mencionados foi utilizada, como controle, a cepa padrão ICB 162 de *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* e ICB 163 de *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii* de *Criptococcus neoformans*.

2.4.2 Sorogrupagem

(Kreger van-Rij, 1984; Kurtzman e Fell, 1998)

As cepas caracterizadas como sendo da espécie *Cryptococcus neoformans*, passaram pela etapa de tipagem bioquímica em meio CGB (Anexo 5), com o objetivo de identificar as variedades. Esta técnica apresenta como princípio o fato do *C. neoformans* variedade *neoformans* ser sensível à L-canavanina e incapaz de assimilar a glicina, que são componentes do meio, ficando, este, com coloração amarelada. Ao contrário, a variedade *gattii* possui a capacidade de utilizar a glicina, levando a produção de amônia que altera o pH, resultando na viragem do indicador de pH, o azul de bromotimol, e tornando o meio azul cobalto.

A semeadura em meio CGB se deu com culturas jovens (cultivo prévio de 48-72 horas), e a inoculação realizada em ponto único, colocado no centro das placas de Petri. Os testes foram feitos em duplicata com incubação em estufa a 32°C. O controle dos inoculados foi obtido com cepas de *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* e *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii* pertencentes ao acervo micológico do LLPA-UFRRJ

2.4.3 Biotipagem “Killer”

(Segundo Boekhout & Scorzetti, 1997)

Entende-se por sensibilidade “in vitro” a toxinas “Killer”, a formação de halo transparente ao redor das cepas padrões utilizadas, como resultado da ação das toxinas produzidas por estas cepas sobre as cepas de *Cryptococcus neoformans*, que neste caso não apresentarão crescimento. Outra possibilidade que indica da mesma forma a sensibilidade, é a presença de colônias azuladas ao redor das cepas, devido ao efeito de azul de metileno que penetra no citoplasma das células mortas. A ausência de halos ou de pigmentação azul das colônias indica a não sensibilidade às toxinas.

Para este teste, todas as cepas de *Cryptococcus neoformans* isoladas foram repicadas com antecedência de 48 horas em ágar Sabouraud dextrose (Micromed®), com posteriores suspensões em solução salina estéril, para padronização compatível com o grau 0,5 da escala McFarland. Cada suspensão foi introduzida em placa de Petri e identificada segundo o número da cepa.

Em seguida, a estas suspensões misturou-se o meio contendo extrato de levedura, peptona e dextrose (YEPD modificado – anexo 6), em um volume de 10 mL, fundido e resfriado a 50°C. Para a completa homogeneização do conjunto promoveu-se movimentos “em oito”, regulares e lentamente circulares, em superfície plana na cabine de segurança biológica. Após a completa solidificação, cada placa foi inoculada com as cepas “Killer”, previamente ativadas por cultivo de sete dias em meio YEPD modificado.

A aplicação das cepas “Killer” foi efetuada em pontos equidistantes em sentido horário, com a utilização de alça microbiológica na seguinte ordem:

CBS 139 *Cryptococcus laurentii* (Kufferath)
CBS 4736 *Filobasidium capsuligenum* Rodrigues Miranda
CBS 7235 *Cryptococcus laurentii* (Kufferath)
CBS 7717 *Cryptococcus podzolicus* (Bab’eva & Reshetova)
CBS 7857 *Cryptococcus laurentii* (Kufferath)
CBS 4281 *Cryptococcus humicola* (Daszewska) Golubev

Estas cepas foram obtidas junto ao Laboratório de Leveduras na Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia do ICB-USP e são atualmente mantidas no LLPA-UFRRJ. A cepa ICB 162 – *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* e cepa ICB 163 *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii* forma utilizadas como padrões. As incubações foram feitas a 25°C por cinco dias, com leituras a partir das primeiras 48 horas. Os padrões de sensibilidade a toxinas “Killer” podem ser verificados na tabela 2.

Tabela 2 – Padrões de Sensibilidade às Toxinas Killer

Tipo de Sensibilidade	Variedade	Cepas Killer					
		139	4736	7235	7717	7857	4281
I	<i>neoformans</i>	-	-	-	-	-	-
II	<i>neoformans</i>	-	+	-	-	-	-
III	<i>neoformans</i>	-	+	+	-	-	-
V	<i>neoformans</i>	-	+	+	+	-	-
V	<i>gattii</i>	+	+	+	-	-	-
VI	<i>gattii</i>	+	+	+	+	-	-
VII	<i>gattii</i>	+	+	+	+	+	-
VIII	<i>gattii</i>	+	+	+	-	+	-
IX	<i>gattii</i>	+	+	+	+	-	+
X	<i>gattii</i>	+	+	+	-	-	+

+ Sensível – Não sensível

Segundo Boekhout e Scorzetti, 1997

2.5 Fatores de Virulência

2.5.1 Produção de Protease

(Rüchel et al., 1982)

A produção de protease foi avaliada através de um meio de cultura contendo uma parte básica e de uma porção contendo albumina bovina, esterilizadas respectivamente por autoclavação e filtração em membrana de Millipore 0,22 μ , homogeneizadas após resfriamento da parte básica a 50°C, e distribuídas em placas de Petri.

A semeadura se deu com inoculação em ponto único na parte central de cada placa de Petri. O controle positivo do teste foi feito, com uma cepa de *Candida albicans* (ICB-USP 12A), conhecida produtora de protease. Todas as cepas foram testadas em duplicata e incubadas a 32°C com leituras do primeiro ao 15° dia, em dias intercalados.

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

$$Pz = dc / dcp$$

Após a observação visual da presença de zona proteolítica, transparente, medidas dos dc e dcp foram aferidas para efetuação do cálculo anterior, com a utilização de régua graduada em centímetros com subdivisões em milímetros. Ao longo dos 15 dias foram avaliados o crescimento dos diâmetros dos halos, sendo considerados definitivos, e próprios para o cálculo de Pz, os diâmetros que não mais sofriam alteração de tamanho. Os resultados encontram-se classificados de acordo com a tabela 2.

2.5.2 Produção de Fosfolipase

(Price et al, 1982)

Para o teste de fosfolipase foi utilizado o meio, que em sua composição apresenta gema de ovo e CaCl_2 (Anexo 7). As cepas utilizadas, e o controle positivo (*Candida albicans* 12 A) foram inoculados em meio Sabouraud dextrose a 4% com antecedência de 48 horas para que realização do ensaio com células novas. Os testes foram realizados em duplicata, com inoculação puntiforme na superfície do meio de cultura na região central da placa de Petri. A incubação se deu em estufa regulada para a temperatura de 32°C. As leituras foram realizadas em dias alternados do primeiro ao 15º dia.

As cepas produtoras de fosfolipase produzem um halo de precipitação ao redor da colônia, formado devido a deposição de cloreto de cálcio, apresentando visibilidade marcante e aspecto densamente opaco. O valor da atividade fosfolipásica (Pz) foi medido pela razão do diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro formado pela colônia mais a zona de precipitação (dcp).

$$Pz = dc / dcp$$

Após a observação visual da presença de zona de precipitação, medidas dos dc e dcp foram aferidas para o cálculo anterior, com a utilização de régua transparente, graduada em centímetros e subdivisões em milímetros. Ao longo dos 15 dias foram avaliados o crescimento dos diâmetros dos halos, sendo considerados definitivos, e ideais para o cálculo de Pz, os diâmetros que não mais sofriam alteração de tamanho. Os resultados encontram-se classificados de acordo com a tabela 2.

Tabela 3 – atividade enzimática de protease e fosfolipase padronizadas para *C. neoformans*

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

Atividade Enzimática de Acordo com Price et al, 1982

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção das amostras

A escolha do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman, para obtenção das amostras, ocorreu devido ao fato do mesmo possuir um laboratório de referência no diagnóstico de raiva, no Estado do Rio de Janeiro. Desta forma, recebe periodicamente, de inúmeras regiões do Estado, fragmentos de sistema nervoso central de animais domésticos e silvestres com sintomatologia sugestiva de raiva. A referida instituição, gentilmente, cedeu os materiais de cães e gatos, o que nos proporcionou periodicamente o quantitativo necessário para o trabalho de isolamento e identificação.

As amostras eram provenientes de animais, que apresentavam histórico de agressividade, sintomatologia nervosa, e na maior parte dos casos, sem vacinação. Tais informações nos remetem à possibilidade de muitos animais serem portadores do vírus rábico, apresentando sintomatologia com envolvimento neurológico, tendo, freqüentemente, episódios de agressividade. Os distúrbios de SNC podem acometer todas as espécies, e promovem sintomatologias diversas. Podem promover quadros de insuficiência respiratória, paralisias motoras, nistagmo, opstótomo, além de agressividade generalizada. A etiologia alberga inúmeras possibilidades como intoxicações, traumas, parasitismo por protozoários, formas larvares de *Taenia* spp , entre outros. Percebe-se, desta forma, que a variedade de causas para um quadro neurológico, torna essencial a busca de um diagnóstico acurado e eficiente, não apenas pela descoberta de qual agente, é o responsável pelos distúrbios apresentados, mas ainda, pela preocupação em nível de saúde pública, considerando que muitas doenças infecciosas, entre elas a raiva, apresentam-se inseridas no contexto de zoonoses oferecendo perigo à população.

A utilização de amostras de sistema nervoso central de cães e gatos compatibiliza-se com o interesse de fazer um diagnóstico diferencial de síndromes neurológicas. Por outro lado, preocupamo-nos também com os índices de criptococose nos animais domésticos. A associação do *Cryptococcus neoformans* à manifestações clínicas correspondentes ao SNC, é expressa na literatura científica como demonstram, Pereira e Coutinho, (2004) concordando, ainda, com Sá et al., (2004) quando relacionam este sistema como o sítio de maior tropismo da levedura, caso em que o quadro sintomático é severo.

As cepas obtidas do ICB-USP, enquadraram-se no objetivo de comparação, com os isolados de SNC do LLPA-UFRRJ, por se tratarem de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus laurentii* todos de origem clínica.

A partir do processamento das 201 amostras obtidas no Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman, foi observado o crescimento de colônias nas primeiras 48 horas. Nas placas contendo dopamina, três materiais apresentaram colônias com características morfocoloniais, como cor marrom e aspecto mucóide, típicas do microrganismo em estudo, enquanto um material apresentou colônias de cores levemente marrons, mais próximas à cor ocre e com aspecto menos mucóide. A numeração e periodicidade da coleta de tais amostras suspeitas seguem na tabela 4.

Tabela 4 – Resultados do isolamento de *C. neoformans* de cães e gatos oriundos do IMVJV / Rio de Janeiro

Cepa	Origem	Idade	Sexo	Data de coleta
528	Cão	-	M	10/2004
195	Cão	-	M	05/2005
283	Cão	-	M	05/2005
476	Cão	3 anos	M	07/2005

Todas as cepas isoladas eram provenientes de SNC de cães (*Canis familiaris*). A cepa 528 era pertencente a um cão da raça Dog Alemão, de idade ignorada, sexo masculino e sem histórico de vacinação para qualquer patologia. Antes do óbito, o animal apresentava sintomatologia neurológica. As Cepas 195 e 283 eram de cães de rua, sendo o primeiro sem raça definida e o segundo um Cocker Spaniel, ambos adultos. Já a cepa 476 foi originada de um cão SRD, macho e com três anos.

Os números atribuídos às cepas são os números de registros das fichas clínicas dos animais no referido Instituto de origem e da ficha de identificação de leveduras no LLPA-UFRRJ (Anexo 8)

3.2 Processamento das amostras

As amostras foram processadas de acordo com protocolos já estabelecidos para excretas e outras fontes ambientais. O procedimento para as suspensões realizadas em tampão salina com cloranfenicol, segue a metodologia utilizada por Baroni, (2006) e Brito et al, (2004), diferindo apenas no volume empregado que, em nosso trabalho, foi fixo (200 mL). A agitação magnética por 10 minutos proporcionou a homogeneização das amostras trituradas com o tampão salina.

Para a sedimentação das amostras empregamos o período de uma hora, diferindo de Baroni, (2006) que utilizou em seus trabalhos, com excretas, o tempo de 30 minutos. Esse maior emprego de tempo relaciona-se à necessidade, uma vez que a consistência de material, proveniente de cérebro, cerebelo e bulbo é mais densa, com a formação, após a trituração, de resíduos teciduais que permanecem mais tempo em suspensão. O período de 60 minutos foi o preconizado, após observação de que a formação de duas fases distintas só foi possível neste intervalo de tempo.

Todos os materiais provenientes de SNC possuíam fragmentos do cérebro, cerebelo e bulbo. A utilização das três partes vai de encontro à possibilidade do *Cryptococcus* spp poder colonizar diversos segmentos de SNC, tornando, com isso, necessário o processamento de todos os fragmentos. Como os materiais foram fornecidos sem a separação das distintas áreas anatômicas, a presença da levedura em uma delas possibilitaria a contaminação da outra.

As lâminas confeccionadas a partir de material triturado, para microscopia, não forneceram evidências de presença de levedura, apenas com exceção da amostra 476 que apresentava formações globosas nos tecidos triturados, mas que não permitia, contudo, a caracterização plena das leveduras.

O emprego da técnica de histopatologia permitiria visualizar no tecido, a presença da levedura. No entanto, a quantidade de material com a qual trabalhamos era pequena, principalmente nas amostras de felinos, e não havia sido fixada em formol a 10% em tempo hábil para a elaboração da técnica, já que recebíamos o material após a utilização pela referida instituição, que realizava o exame para diagnóstico de raiva em todas elas. Os tecidos removidos do corpo de um animal devem ser adequadamente fixados logo após sua retirada (Junqueira e Carneiro, 1995). Ainda assim há autores que utilizam esta técnica como diagnóstico, como demonstrado por Grecco e Moreno (2003) ao trabalharem com um gato, Pereira et al. (2005) ao diagnosticarem a presença da levedura em ovino com suspeita de criptococose nasal e Macedo et al (2005) que identificaram um caso de criptococose cerebral em bovino. Chiesa (1998) em seu trabalho de mestrado estudou os aspectos clínico-epidemiológicos da criptococose felina, e ao empregar a histopatologia pôde constatar que alguns animais positivos para *Cryptococcus neoformans* através da cultura e sorologia, não apresentaram evidências da levedura nos tecidos afetados.

Outro fator que nos incita a questionamentos é a permanência das amostras sob congelamento à temperatura de -20°C (tempo empregado no IMVJV), o que poderia inviabilizar a sobrevivência do microrganismo no processo de congelamento-resfriamento rompendo as células pelo efeito da cristalização da água. Apesar desta suspeita, obtivemos resultados positivos em amostras que foram submetidas ao mesmo processo. Stokes (1971) ao descrever a influência da temperatura sobre leveduras menciona que as mesmas são resistentes às baixas temperaturas, apesar de algumas injúrias e a morte poderem ocorrer. Ainda assim é fato que algumas leveduras conseguem sobreviver nas regiões polares. Campbell (1943) apud Stokes (1971), trabalhou com *Saccharomyces cerevisiae* e percebeu a destruição de 48-92% das células ao fazer suspensão em água a -30°C ou -50°C. Da mesma forma Stille (1950) citado por Stokes (1971) observaram 29,2% de morte do mesmo microrganismo quando submetido a congelamento de -24°C.

3.3 Leitura dos isolados

O isolamento para um correto diagnóstico é de primordial importância (Filiú et al., 2004), principalmente porque a sintomatologia de origem nervosa pode ser sugestiva de inúmeros distúrbios, de etiologias variadas. Pereira e Coutinho (2003) citam os exames citológicos, histopatológicos, os testes sorológicos, a biologia molecular e o isolamento em meios seletivos como métodos diagnósticos. Sant'ana et al, (1999), basearam o diagnóstico de criptococose em felino através da histopatologia e necropsia. Já Filho et al., (2004) além da citologia, fecharam seu diagnóstico de criptococose através da cultura em Sabouraud dextrose.

Em nosso trabalho, pelas razões já mencionadas tentou-se o isolamento e a observação microscópica a partir dos triturados do material em esfregaços corados pelo método de Gram.

O tempo de leitura a partir das 48 horas após inoculação em meio contendo dopamina e em Sabouraud dextrose a 4%, foi satisfatório para o crescimento de colônias, como observado por Campos et al., (2005), ao trabalhar com excretas de pombo. O material foi observado por um total de duas semanas, o que possibilitou a percepção de que a cor marrom das colônias nem sempre era evidente nos primeiros dias. Esta característica tornava-se perceptível de melhor forma no decorrer deste período, como demonstrado na

figura 1. Já o aspecto mucóide pôde ser demonstrado nas primeiras observações a partir das 48 horas.

A dificuldade, no entanto, foi o crescimento de outros microrganismos como outras leveduras e fungos filamentosos, que podem ter inibido o crescimento do *Cryptococcus* spp como também observam Marques e Silva, (2004) ao trabalharem com fontes ambientais. As amostras fornecidas pelo Instituto Jorge Vaitsman para o trabalho eram provenientes de cadáveres de cães e gatos submetidos à necrópsia na própria instituição ou de fragmentos de SNC enviados de outras instituições. As duas formas de obtenção das amostras pelo instituto podem não ter ocorrido de forma asséptica, possibilitando a contaminação do mesmo por outros agentes que habitam comumente o pelo dos animais, os instrumentos utilizados e até mesmo o ar do ambiente de trabalho.

Das colônias isoladas e selecionadas para microscopia, foi possível observar, com tinta da China e/ou com lactofenol e azul de algodão à objetiva de 40X, células redondas ou levemente ovaladas, com a presença de cápsula como demonstrado nas figuras 2, 3 e 4. A técnica empregando a tinta da China revelou-se melhor para a evidenciação de cápsula, embora em nosso trabalho tenhamos empregado os dois métodos.

A proporção de quatro materiais suspeitos em 201 amostras é numericamente pequeno. Porém, ao considerarmos o caráter oportunista desta micose, acometendo principalmente indivíduos imunocomprometidos (Fernandes et al, 1999; Farias filho, et al, 2004; Fontenele et al, 2004), nosso resultado torna-se compreensível. Tais resultados concordam com Lavelly e Lipsitz (2005) que consideram como incomuns as infecções fúngicas no sistema nervoso central de cães e gatos.



Figura 1- Isolamento de *C. neoformans*, demonstrando colônias de cor marrom em meio contendo dopamina. Cepa 476.

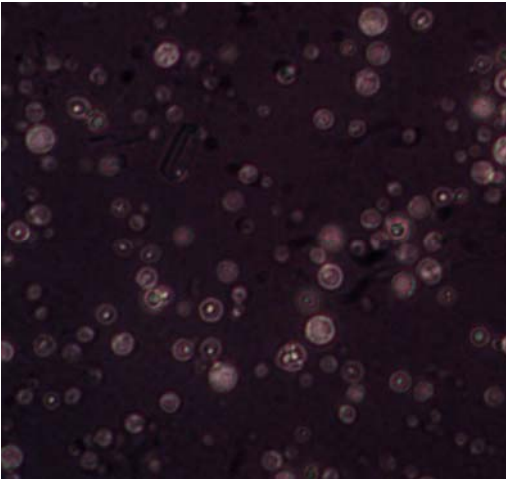


Figura 2- Microscopia óptica de *C. neoformans* utilizando Tinta da China . 400X.

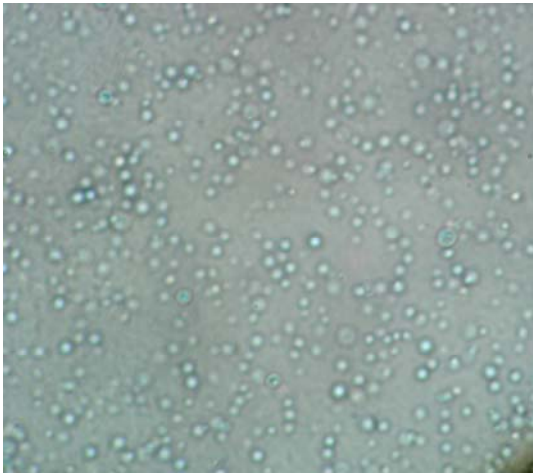


Figura 3- Microscopia óptica de *C. neoformans* corado com lactofenol com azul de algodão 400

3.4 Identificação de gênero e espécie

O perfil de assimilação de açúcares e de fontes nitrogenadas (auxanograma) bem como a fermentação (zimograma) negativa foram compatíveis com o esperado para o gênero. As espécies de *Cryptococcus* spp identificadas bem como a espécie animal e origem das amostras encontram-se representados na tabela 5. Nesta mesma tabela relacionamos as cepas isoladas em São Paulo.

Tabela 5- Relação de cepas isoladas, espécie de *Cryptococcus* spp e espécie animal da qual foi isolada

Cepa 528	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Cão	LLPA-UFRRJ
Cepa 195	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Cão	
Cepa 283	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Cão	
Cepa 476	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Cão	
Cepa LLPA 010	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Cão	
ICB 253	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Cão	ICB-USP
ICB 277	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Gato	
MR1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Gato	
MR3	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Gato	
MR5	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Gato	
Tati Fel	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Gato	
O1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Cão	

As fontes assimiláveis pelo *Cryptococcus neoformans* através do auxanograma foram galactose, maltose, rafinose, xilose, arabinose, D-glicosamina, n-acetilglicosamina, inositol. O *Cryptococcus laurentii*, apresentou assimilação distinta, como à lactose e melibiose, não assimiláveis pelo *C. neoformans*.

Conforme o protocolo de identificação empregado, foi realizado o teste de produção de urease em meio Christensen (anexo 4) que demonstrou de forma qualitativa a produção em todos os isolados como demonstrado na figura 4. A urease é uma enzima que catalisa a hidrólise da uréia à amônia e já é conhecida como fator de virulência para algumas bactérias (Murray et al., 1994). Há, no entanto, como relatam Bava et al. (1993) e Olszewski et al. (2004) cepas de *Cryptococcus neoformans*, urease negativas. Cox et al., (2000) citam, com relação ao *Cryptococcus neoformans*, que obtiveram resultados através da clonagem e sequenciamento do gene URE 1, que sugerem que a atividade da urease está envolvida com a patogenia da levedura. Apesar do caráter qualitativo deste teste, em nosso trabalho, pode-se constatar que todas as cepas promoveram a reação nas primeiras 24 horas, demonstrando um grau máximo de coloração a partir de 48 horas. A avaliação quantitativa, apesar de não ser o objetivo deste trabalho, pode ser mais uma forma de avaliação do grau de virulência, trabalhando com as cepas diluídas na escala McFarland e comparando precocidade e intensidade na reação de cor do meio.



Fig 4- Teste de produção de urease. Cepa ICB 253, demonstrando reação positiva com coloração rosa.

3.5 Sorogrupagem

As Cepas 476, MR1 e LLPA 010, assim como o controle ICB 162 correspondente a variedade *gattii* apresentaram alteração da cor no meio C.G.B. promovendo a formação de coloração azul cobalto, classificando-se desta forma como *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii*. As demais cepas utilizadas, além da cepa controle ICB 163 correspondente a variedade *neoformans*, não promoveram alteração de cor no meio C.G.B. e foram classificadas como *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans*. A alteração para azul cobalto no meio CGB está ilustrada nas figuras 5 ,6 e 7.

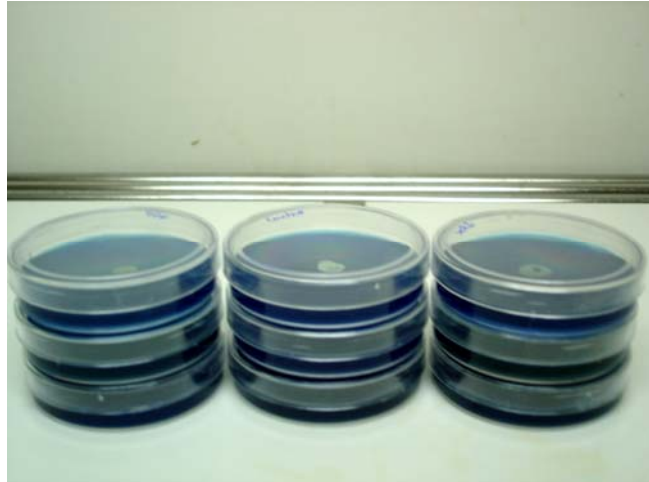


Fig. 5 – Sorogrupagem em meio CGB – cepas pertencentes a variedade *gattii*. Cepas, 476, MR1 e LLPA 010, apresentando reação positiva e mudança de cor para azul.

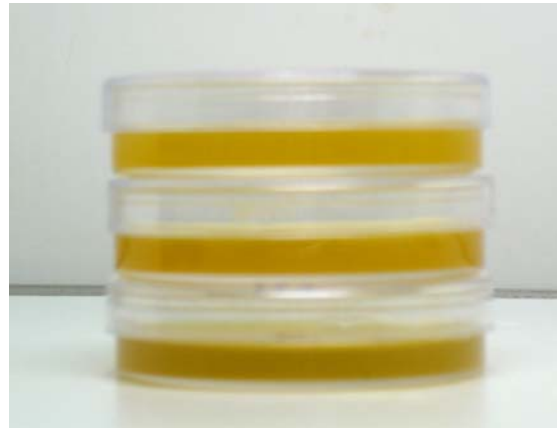


Fig. 6 – Sorogrupagem em meio CGB – cepas pertencentes a variedade *neoformans*. Cepa 195, apresentando reação negativa e meio sem alteração de cor



Fig 7 – Comparação da coloração em meio CGB de cepas pertencentes a variedades *gattii* e *neoformans*. Cepas 476 e 195 respectivamente.

3.6 Biotipagem “Killer”

A resposta de cada cepa de *Cryptococcus neoformans* aos padrões “Killer” e os respectivos biotipos demonstrou que as nove cepas da variedade *neoformans* encontram-se enquadrados no tipo II. A cepa MR1 correspondente à variedade *gattii* apresentou sensibilidade correspondente ao tipo VIII., ao passo que as cepas 476 e LLPA 010 não apresentaram sensibilidade aparente. Podemos avaliar na figura 8 um dos testes realizados para a cepa MR1 que apresentou um padrão de sensibilidade a toxinas “Killer”.

O resultado verificado para a cepa MR1 (revelada como biotipo VIII) é uma confirmação do fato da mesma ter apresentado positividade em meio CGB, embora Boekhout e Scorzetti (1997), tenham determinado seis biotipos diferentes para esta variedade. Da mesma forma, as cepas classificadas como biotipo II servem como confirmação dos resultados com elas obtidos em meio CGB, uma vez que naquele meio não ocorreu crescimento. Cabe lembrar, no entanto, que Boekhout e Scorzetti (1997), criaram quatro biotipos para a variedade *neoformans*.

As cepas LLPA 010 e 476 foram classificadas como biotipo I. No entanto, foram de crescimento positivo em meio CGB. Este resultado pode ter alguns significados como erro de execução de técnica do CGB, (contaminação e etc) ou a não total eficiência da tipagem “Killer”, o que vai de encontro ao apresentado por Baroni, 2001 que sugere a possibilidade da presença de novos sorogrupos ou tipo ou até mesmo que estas cepas não estejam enquadradas no método empregado por Boekhout e Scorzetti, 1997. Além disso os seis biotipos da variedade *gattii* foram criados a partir de apenas 32 cepas.

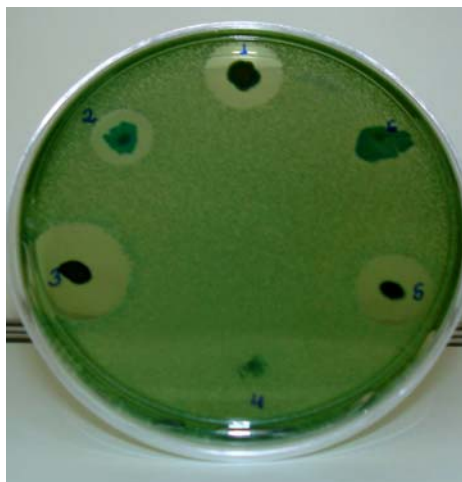


Fig 8 – Biotipagem “Killer”. Cepa MR1 demonstrando sensibilidade compatível com o biotipo VIII

3.7 Produção de exoenzimas

A produção de exoenzimas pode ser considerada como um fator de virulência, garantindo ao *Cryptococcus neoformans*, maior resistência ao meio e capacidade para invadir e colonizar tecidos. Autores concordam que o pigmento melanina protege a célula contra o estresse físico, garantindo à mesma um maior potencial de patogenicidade (Silveira et al., 2004), podendo ser associada ao grau de virulência (Doering et al., 1999). No entanto as cepas podem produzir a enzima fenoloxidase em maior ou menor escala o que poderia influenciar no grau de pigmentação das colônias. Não foi nosso objetivo estudar a produção de fenoloxidase como fator de virulência, mas algumas cepas aparentemente revelaram-se mais pigmentadas, o que poderia significar uma maior produção desta enzima e, talvez, uma maior virulência. A urease também pode ser considerada um fator de virulência facilitando a levedura na penetração dos tecidos do hospedeiro como demonstram Olszewski et al (2004). Em nosso trabalho avaliamos a produção de protease e fosfolipase, também considerados fatores de virulência, já que facilitam a invasão do tecido do hospedeiro (Aoki et al., 1994; Ganendren et al., 2006) garantindo o primeiro estágio do processo, associado à adesão ao epitélio pulmonar.

3.7.1 Produção de protease

Todas as cepas utilizadas apresentaram produção de protease, diferindo apenas nos valores do Pz. Das doze amostras, nove foram consideradas fortemente positivas e três positivas. As variações encontradas entre as cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus laurentii* isoladas no Rio de Janeiro e São Paulo, podem ser avaliadas através da tabela 6.

Tabela 6 -Resultado dos testes de produção protease						
Cepas	Espécie ^a	Local	dcp	Dc	Pz	Classificação ^b
Mr3	<i>C. N</i>	SP	2,2	0,6	0,27	3
528	<i>C L</i>	RJ	3,5	1	0,28	3
195	<i>C N</i>	RJ	3	1,1	0,36	3
Tati	<i>C N</i>	SP	2,1	0,8	0,38	3
283	<i>C N</i>	RJ	3,5	1,4	0,4	3
253	<i>C L</i>	SP	3	1,2	0,4	3
Icb 177	<i>C N</i>	SP	2,8	1,3	0,46	3
LLPA 010	<i>C N</i>	RJ	2,2	1,2	0,54	3
Mr5	<i>C N</i>	SP	3	1,8	0,6	3
O1	<i>C N</i>	SP	2	1,3	0,65	2
476	<i>C N</i>	RJ	2,1	1,4	0,66	2
Mr1-	<i>C N</i>	SP	2,2	1,8	0,81	2
Des. Padrão					0,17	
Média					0,49	

a- *CN* = *C. neoformans*; *CL* = *C. laurentii*; b- 3= fortemente positivo; 2= positivo

A partir de nossos resultados foi possível evidenciar a produção de protease de forma significativa em todos os isolados não havendo diferenças marcantes entre cepas oriundas de São Paulo e Rio de Janeiro. Não existem contrastes acentuados, o que pode sugerir que, por serem cepas de origem clínica, o potencial enzimático seja desenvolvido de forma semelhante.

As duas cepas de *Cryptococcus laurentii* apresentaram Pz compatível com a classificação fortemente positiva. Sete das dez cepas de *Cryptococcus neoformans* apresentaram-se como fortemente positivas, para a produção de protease.

O comportamento das variedades refletiu para a variedade *gattii* a proporção de 1/3 fortemente positivo, referente à cepa 253, enquanto as cepas 476 e MR1 apresentaram padrão positivo. Para a variedade *neoformans*, encontramos seis dos sete isolados como fortemente positivo e um positivo como demonstrado na tabela 5.

A média geral representou um percentual que reflete o caráter fortemente positivo do grupo estudado, com a possibilidade de algumas variações de acordo com o desvio padrão encontrado.

O perfil de produção de protease classificou nove das doze cepas como fortemente positivas e três como positivas. A maior parte das cepas originadas de excretas

de aves, sejam pertencentes à variedade *neoformans* ou *grubii*, não são produtoras de protease, expressando este potencial após inoculação *in vivo* (Silva et al, 2005; Silva et al, 2006). As cepas de origem clínica, em nosso trabalho, colonizam substrato que provavelmente induz a levedura na expressão desta característica, como mencionam, Muller e Sethi, (1972), em seus relatos, que cepas de *Cryptococcus neoformans* produziram protease capaz de digerir plasma humano.

4.2 Produção de fosfolipase

Todas as cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus laurentii* isoladas, provenientes do Rio de Janeiro e São Paulo apresentaram produção de fosfolipase, diferindo nos valores de Pz encontrados conforme demonstrado na tabela 7

Tabela 7 - Resultado dos testes de produção de fosfolipase						
Cepas	Espécie	Local	dcp	Dc	Pz	Classificação
Mr5	CN	SP	3,5	1,3	0,37	3
Mr3	CN	SP	2,5	1	0,4	3
283	CN	RJ	2,8	1,1	0,4	3
ICB 277	CN	SP	3	1,3	0,4	3
O 1	CN	SP	2,7	1,2	0,44	3
Tati	CN	SP	3,5	1,6	0,46	3
528	CL	RJ	3,2	1,6	0,5	3
195	CN	RJ	3,0	1,6	0,53	3
Mr1	CN	SP	2,6	1,4	0,54	3
253	CL	SP	2	1,2	0,6	3
476	CN	RJ	1,6	1,1	0,7	2
LLPA 010	CN	RJ	2,3	2	0,86	2
Des. Padrão					0,14	
Média					0,52	

CN = *C. neoformans*; CL = *C. laurentii*; 3= fortemente positivo; 2= positivo

A partir da tabela 6 observou-se não haver diferenças marcantes entre as cepas do Rio de Janeiro e São Paulo. As cepas de *Cryptococcus laurentii* apresentaram-se como fortemente positivo. As cepas de *Cryptococcus neoformans* apresentaram padrão fortemente positivos em oito de dez isolados, enquanto o padrão positivo foi encontrado em apenas duas cepas desta espécie.

A avaliação da produção de fosfolipase demonstrou que a variedade *gattii* apresentou padrão fortemente positivo correspondente a cepa MR1 e positivo para as cepas 476 e LLPA 010. Já a variedade *neoformans* expressou padrão fortemente positivo para todos os isolados.

A fosfolipase apresentou um padrão semelhante ao da protease revelando, contudo, um Pz médio maior, concordando com Pereira et al., (2005).

As duas cepas de *Cryptococcus laurentii* apresentaram-se fortemente positivas quanto à produção de protease e fosfolipase. Tais resultados demonstram considerável importância, pois alguns trabalhos relacionam a presença desta espécie no ambiente, como madeira, poeira doméstica e excretas de pombos (Bernardo et al., 2001; Carvalho et al., 2004; Vieira et al., 2004), comumente associados ao *Cryptococcus neoformans*. Desta forma podemos sugerir que a estreita relação do homem e de animais com os diversos fatores ambientais seja um potencial fator de risco, principalmente quando consideramos o grau de virulência das cepas em estudo em nosso trabalho. Tais dados proporcionam informações sobre o caráter oportunista desta espécie como também observam Kordossis et al. (1998) ao isolar o agente a partir de um caso de meningite em paciente com AIDS, e com Simon et al. (2005) quando do isolamento *Cryptococcus laurentii* em criança imunossuprimida.

Respectivamente 2/3 e 1/3 das cepas de *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii* apresentaram-se positivas e fortemente positiva, tanto para o teste de produção de protease quanto de fosfolipase.

Para a variedade *neoformans* houve um resultado positivo para produção de protease sendo os demais considerados fortemente positivos. Já a produção de fosfolipase demonstrou um perfil fortemente positivo para todas as cepas desta variedade.

Os testes de protease e fosfolipase se relacionam com o grau de virulência. Segundo Casadevall e Perfect (1998) a capacidade de produzir protease capacita o *Cryptococcus neoformans* na degradação de tecido do hospedeiro e na destruição de proteínas imunologicamente importantes. Da mesma forma, uma maior produção de fosfolipase pode favorecer a invasão de diversos tecidos, chamando a atenção principalmente para pulmão e cérebro. A secreção de fosfolipase é necessária para a iniciação da infecção pulmonar já que facilita a adesão ao epitélio local e disseminação do agente para os diversos tecidos por via hematogênica e linfática (Ganendren et al., 2006). Observou-se que cada uma das cepas pode apresentar potencial distinto ao atuar sobre proteínas e fosfolipídios, já que as variações de Pz foram de 0,27 a 0,81 para a produção de protease e 0,37 a 0,86 para a produção de fosfolipase. Além disso, obtivemos um desvio padrão de 0,17 para protease e 0,14 para fosfolipase, o que nos possibilita algumas oscilações nesses valores.

Com os dados apresentados pode-se perceber que células de *Cryptococcus neoformans*, presentes comumente no ambiente, podem colonizar tecidos animais, expressando forte atividade enzimática e conseqüentemente oferecem potencial risco, principalmente a populações imunossuprimidas, que entrem em contato com o agente em qualquer das fontes em que ele esteja presente.

4. CONCLUSÕES

- 4.1 As técnicas utilizadas para o isolamento de *Cryptococcus neoformans*, de material de SNC demonstraram ser eficientes e poderão ser empregadas em outros ensaios.
- 4.2 O material a fresco utilizado para confecção de lâminas destinadas à microscopia em nosso trabalho, nem sempre é conclusivo para o diagnóstico de *Cryptococcus neoformans* uma vez que os materiais revelaram-se positivos somente no isolamento;
- 4.3 Há necessidade de um maior tempo para a sedimentação de material tecidual em suspensões em relação ao tempo utilizado com excretas;
- 4.4 A histopatologia pode ser um recurso utilizado, mas apenas o isolamento pode fornecer dados mais concretos quanto ao gênero e espécie, contribuindo para informações de caráter ecológico, epidemiológico e patológico.
- 4.5 A biotipagem “killer” pode apresentar resultados discrepantes com a tipagem em meio CGB.
- 4.6 A produção de protease revelou padrão semelhante entre as cepas do Rio de Janeiro e de São Paulo, espelhando o caráter fortemente positivos de cepas de origem clínica do nosso trabalho;
- 4.7 Os dois isolados de *Cryptococcus laurentii* apresentaram padrão fortemente positivo para a produção de protease e produção de fosfolipase, ressaltando o potencial patogênico desta espécie;
- 4.8 A colonização tecidual pode exigir do *Criptococcus* spp a expressão da produção de exoenzimas para sua melhor implantação considerando-se que nenhuma cepa apresenta padrão enzimático negativo.
- 4.9 A semelhança de comportamento das cepas originadas do Rio de Janeiro e São Paulo permite levantar a hipótese que por serem cepas de origem clínica tanto o *Cryptococcus neoformans* quanto *Cryptococcus laurentii* demonstram mesmo padrão enzimático independente de sua distribuição geográfica.
- 4.10 Sintomas neurológicos podem ser devidos, além de outros fatores à presença de *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* e variedade *gattii*
- 4.11 Podemos relacionar a presença de *Cryptococcus laurentii* ao diagnóstico diferencial de neuropatias

- 4.12 Faz-se necessária uma relação mais estreita com ambulatórios e hospitais veterinários, utilizando materiais de origem clínica variada para uma avaliação mais ampla quanto ao diagnóstico diferencial dos vários distúrbios encontrados na clínica veterinária
- 4.13 Outros materiais, como sangue, líquido e soro, devem ser requisitados para avaliar a presença de *Cryptococcus* spp
- 4.14 Este trabalho pode ser considerado o primeiro que propõe a criptococose como diagnóstico diferencial de síndromes neurológicas, em cães e gatos, a partir de isolamentos de sistema nervoso central.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. & LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro. Elsevier editora Ltda, 2005. 579 p.

ACOSTA, B.; ALVAREZ, P.; DENIZ, S.; RODRIGUEZ, L.; RERAL, F. & ROSÁRIO, I. **Linfadenitis canina por *Cryptococcus neoformans***. **Rev Iberoam Micol**. N.16,V.4,p.155-157,1999.

AOKI, S.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K.; KATO, J.; NINOMYA, K.; VIDOTO, V. Extracellular proteolytic activit of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, V.128,p.143-50, 1994.

BARÓ, T.; TORRES-RODRIGUES, J. M.; MENDOZA, M. H.; MORERA, Y. & ALÍA, C. First identification of Autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. **Journal of Clin Microbiol**. V.36,N.2,p.:458-61, 1998.

BARONI, F. A. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos localizados em torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro: fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos. São Paulo, 2001. (Tese de doutorado – Universidade de São Paulo)

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

BATISTA, L. & SILVA, M. V. Criptococose. In: VERONESI, R.; FACACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. V. 2, São Paulo: Ed. Atheneu. p.112-1115, 1997.

BAWENS, L.; SWINNE, D.; De VROEY, C; MEURICHY, D. Isolation of *Cryptococcus neoformans*. Var *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. **Mykosen.**, V.29,p.292-4, 1986.

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

BERNARDO, F. M.; MARTINS H. M. & MARTINS, M. L. Fontes urbanas de *Cryptococcus* spp – Lisboa. **Rev Port. de Ciên Vet**. V.96, N.539,p.157-60, 2001.

BOEKHOUT & SCORZETTI. Differential Killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryptococcus neoformans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, V.35,p.147-49,1997.

BRITO, E. O. D.; JOHANN, S.; SILVA, G. J.; OLIVEIRA, M. C.; ARANTES, R. R. & RESENDE, M. A. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fontes ambientais em Belo Horizonte, Minas Gerais . In: do IV Congresso Brasileiro de Micologia, **Anais...** Ouro Preto-MG, 2004. p.56.

BUCHANAN, K. L. & MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerg. Infect Dis.** V.5, N. 1, 1998.

CAMPOS, F. L.; PEREIRA, J. R.; FERNADES, M. L.; SPUNAR, V. F. & BARONI, F. A. Excretas de pombos como fontes de *Cryptococcus neoformans* em torre de igreja em Setetiba – RJ. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. **Anais...**Santos-São Paulo, 2005. 1 CD-ROM

CAMPOS, F. L.; PEREIRA, J. R.; FERNADES, M. L.; SPUNAR, V. F. & BARONI, F. A. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* na rede pública de saúde do município do Rio de Janeiro. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. **Anais...**Santos- São Paulo, 2005. 1 CD-ROM.

CARMO-SOUZA, L. Distribution of the yeasts in nature. In: ROSE, A. H. & HARRISON, J. S. The yeasts: Physiology and biochemistry of yeasts. Londres: academic Press .London and New York. 1971. Cap.3.

CARVALHO, V. G.; REIMÃO, J.Q.; VIEIRA, L. S.; FRANCO, M. C. & SIQUEIRA, A. M. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos na zona rural e da zona urbana de Alfenas- MG. In: do IV Congresso Brasileiro de Micologia, **Anais...** Ouro Preto-MG, 2004. p.56.

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

CHAGAS, W.A.; FIGUEIREDO, J. B.; CRUZ, L.C.H & NEVES, J.G. Criptococose cutânea em gato doméstico descrição de um caso. **Rev. Bras. Med. Vet.** V. 1,p.5-12, 1971.

CHAPMAN, H. M.; ROBINSON, W.F.; BOLTON, J.R. & ROBERTSON, J. P. *Cryptococcus neoformans* in goats. **Austr. Vet. J.**, V.67, p,263-5, 1990.

CHAKRABARTI, A; SHARMA, A.; SOOD, A; GROVER, R.; SAKHUJA, V.; PRABHAKAR, S & VARMA, S. Chaning scenario of cryptococcosis in a tertiary care hospital in north India. **Indian J Med Res.** V.112, p.:56-60, 2000.

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

CHIESA, S. C. Criptococose felina- aspectos clínico-epidemiológicos. São Paulo. 1998.(Tese de Mestrado - Universidade de São Paulo).

COETZER, J. A. ; IMES, G. & IRVINE-SMITH, C. Cryptococcosis in adog. **J S Afr Vet Assoc.** V.47,n.1,p.49-52, 1976.

CORREA, M. P. S. C.; OLIVEIRA, E. C.; DUARTE, R. R. B. S.; PARDAL, P. P. O.; OLIVEIRA, F. M. & SEVERO, L. C. Criptococose em crianças no Estado do Pará. **Rev Soc Bras Med Trop.**V.32, n.5,p.505-8,1999.

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

CRISSEY, J. T.; LANG, H. & PARISH, L. C. Manual of medical mycology, Spain, Blacwell Science, 1995.

DARZÉ, C.; LUCENA, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica . **Revista Soc. Bras. De Med. Trop.**, V.33,p.21-6, 2000.

DOERING, T. L.; NOSANCHUK, J. D.; ROBERTS, W. K. & CASADEVALL, A. Melanin as a potential criptococcal defense against microbicidal proteins. **Med Micol.**, 37:175-81. 1999.

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

ELLIS , D. H. & PFEIFFER, T. J.Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* **J. Clin. Microbiol.**, V.28,p.1642-4, 1990.

ELLIS, D. H. & HOWARD, D.H. Virulence serotype and molecular characteristics of enviromental strains of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. **Infec. Immun.**, V.60,p.1869-74, 1992.

FARIAS FILHO, L. P.; NEVES, M. A. SOUZA-CASTRO, G. B. & FORTES, S. T. *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos em Boa Vista/RR. In: do IV Congresso Brasileiro de Micologia, **Anais...** Ouro Preto-MG, 2004. p.45.

FELL, J.; KURTZMAN, C.P. & KWOU-CHUNG, K.J.Proposal to conserve *Cryptococcus*. **Taxon.**, V.38,p.151-2, 1989.

FERNANDES, O. F. L.; SILVA, M. R. R.; RIBEIRO, E. L.; COSTA, T. R.; SILVA, M. V. RODRIGUES, A. B. & QUIRINO, H. M. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolamentos em pacientes com aids no estado de Goiás. **Ver. Pat. Tropical.** 28(1): 49-55, 1999.

FERNANDES, O. F. L. Variedades e sorotipos de *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS e comparação entre dois métodos de susceptibilidade in vitro. **Rev Pat. Trop.** V.30, n.2,p.265-6, 2001.

FILHO, S. T. L. P.; PEREIRA, D. I. D.; SLLIS, E. S. V.; HENRIQUES, G.B. & DALMOLIN, F. Criptococose nasal e cutânea em felino – relato de caso. **Medvep.** V.2,n.5,p.33-7,2004.

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

FRANZOT , S. P.; SALKIN, I. F. & CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.37,p.838-40, 1999.

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

GARCIA, M. E. & BLANCO, J. L. principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. **Rev Iberoam micol.** V.17,p.52-7,2000.

GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G. & DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant infection due to *Cryptococcus neoformans*. In: International Conference on *Cryptococcus* and Criptococcosis. 1999. **Abstracts.**p92.

GHANNOUM, M. A. Potential role od phospholipase in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev.** V.18,n.1,p.122-43, 2000.

GRECCO, F. B. & MORENO, G. Criptococose felina- relato de um caso em Cuiabá – Mato Grosso. In: XI Encontro Nacional de Patologia Veterinária-ENAPAVE. **Anais...**Unesp-Botucatu-SP, 2003.124p.

HAMILTON, A. *Cryptococcus neoformans* – the encapsulated menace. **Mycologist.** V.16,p.125-26, 2002.

IKEDA, R.; SUGITA, T. & SHINODA, T. Serological Realtionships of *Cryptococcus* spp: Distribution of antigenic factores in *Cryptococcus* and Intraspecies Diversity. **Jounal of Clin Microbiol.** V.38,n.11,p.4021-25,2000.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1995. Cap 1.

KERWIN, S. C.; MCCARTHY, R. J.; VANSTEENHOUSE, J. L.; PARTINGTON, B. P. & TABOADA, J. Cervical spinal cord compression caused by cryptococcosis in a dog:

successful treatment with surgery and fluconazole. **J Am Anim Hosp Assoc.** V.34,n.6,p.23-6,1998.

KORDOSSIS, T.; AVLAMI, A.; VELEGRAKI, A.; STEFANOV, I.; GEORGAKOPOULOS, G.; PAPALAMBROU, C. & LEGAKIS, N. J. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus*, cryptococcaemia in AIDS patients. **Med Mycol.** V.36,n.5,p.335-39, 1998.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. (Ed) The yeasts: a taxonomic study . 3^o Edition. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, 1082p., 1984.

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

KWON-CHUNG, K. J. A new genus, *Filobasidiella* The perfect state of *Cryptococcus neoformans* . **Mycologia**, V.67, p.1197-201, 1975.

KWON-CHUNG, K. J. A new species, *Filobasidiella* The sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and sorotypes . **Mycologia**, v.68,p.943-6, 1976.

LARSSON, C. E. ; OTSUKA, M. MIB=CHALANY, N. S.; BARROS, P. S. N.; GAMBALE, W. & SAFATLE, A. M. V. Cryptococose canina: relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. E Zôo.** v.55,n.5, 2003.

LAZERA, M. S.; WANKE, B. & NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.31,p.449-54, 1995.

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

LAZERA, M. S.; IGREJA, R. P. & WANKE, B. Criptococose. In: SIDRIM, J.J.C. & ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos.** 2 Ed. Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. Cap. 24

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

LAWS, L. & SIMMONS, G. C. Cryptococcosis in a sheep. **Austr. Vet. J.**, v.42,p.321, 1996.

LEMONS, L. S. ; SANTOS, A. S. O.; TEIXEIRA, G.N.; RANGEL, M. F. N. & VIERIA, M. O. *Cryptococcus neoformans* isolados de ovinos. In: do IV Congresso Brasileiro de Micologia, **Anais...** Ouro Preto-MG, 2004. p.153

LEVITS, S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **RID.**, v.13,p.1163-69, 1991.

LITMAN, M. L. & BOROK. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*.**Mycopathol. Mycol. Appl.** v.35,p.329-45, 1968.

LOURENÇO, M. G. PELAJO-MACHADO, M.; LAZERA, M. S. LENZI, H. L.; MACEDO, R. C. L. & WANKE, B. Histopatologia da criptococose pulmonar murina por *Cryptococcus neoformans*. I In: do IV Congresso Brasileiro de Micologia, **Anais...** Ouro Preto-MG, 2004. p.123

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

MARTINS, M. A.; PAPPALARDO, M.C.M.; CORNETA, E.C.; MELHEM, M. S. C. & PEREIRA-CHICOLA, V. L. análise por PFGE e RAPD de isolados clínicos seriados de *C. neoformans* no estudo da neurocriptococose em pacientes com AIDS. In: do IV Congresso Brasileiro de Micologia, **Anais...** Ouro Preto-MG, 2004. p.56.

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

MORACE, M. ARCHIBUSACI, C.; SESTITO, M. & POLONELLI, L. Strain differentiation of pathogenic yeast by the Killer system. **Mycopathologia.** v.84,p.81-5, 1984.

MITCHEL , T.G. & PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.8,p.515-48,1995.

MULLER, H.E. & SETHI, K. K. Proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans* against human plasma proteins. **Ed. Microbiol. Immunol.**, v. 158,p. 129-34,1972.

NETTO, T. R.; REPETTI, C. S. F. 7 REIMBERG, T. Relato de caso – criptococose canina. **Arq Bras Vet Zôo.** v.57,n.1.p.24,2005

NEVES, M. A.; SILVA, A. D.; FARIA FILHO, L. P. & FORTES, S. T. novas fontes de *Cryptococcus neoformans* var *gattii* em Boa Vista, Roraima. In: do IV Congresso Brasileiro de Micologia, **Anais...** Ouro Preto-MG, 2004. p.62.

NEWMAN, S. J.; LANGSTON, C. E. & SCASE, T. J. Cryptococcal pyelonephritis in a dog. **J. Am Vet med Assoc.** V.222,n.2,p.180-3, 2003.

NISHIKAWA, M. M.; MORALES, B. P.; MARTINS, L. M. S.; HAGEN, F.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T. & LÁZERA, M. S. Diversidade genética de isolados de *Cryptococcus*

neoformans de origem clínica e ambiental do Brasil. In: do IV Congresso Brasileiro de Micologia, **Anais...** Ouro Preto-MG, 2004. p.112.

OLSZEWSKI, M.; NOVERR, M. C.; CHEN, G.; TOEWS, G. B.; COX, G. M.; PERFECT, J. R. & HUFFNAGLE, G. B. **American Journal of Patology**. V.164,p.1761-1771, 2004.

PAPPALARDO, M. C. S. M. & MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. De São Paulo**. V.45,n.6,p.299-305, 2003.

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

PAULA, C. R.; ITO, C. H.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; CORREA, B. & MINAMI, P. S. Biochemical serotyping and other physiological characteristics os 40 *Cryptococcus neoformans* samples isolated from clinical material in Brazil. In: Congress of ISHAM, 10. **Rev Iber. Micol.**, v.5,p.105, 1998.

PEREIRA, A. C. C. & COUTINHO, S. D. A. Criptococose em cães e gatos – uma revisão. **Clinica Veterinaria**, v.46,p.24-32, 2003.

PEREIRA, R. N.; PEROTTA, J. H.; DUNE, A. C. C.; FERREIRA-LIMA, I. G.; ALESSI, A. C. CARVALHO, A. M.; CANOLA, P. A.CATTELAN, J. W. & CANOLA, J. C. Criptococose nasal em ovinos: relato de caso. **Arq Bras Vet Zôo**. v.57,n.1,p.18,2005

PINTO FILHO, S. T. L.; PEREIRA, D. I. B.; SALLIS. E. S. V.; HENRIQUES. G. B. & DALMOLIN, F. Criptococose nasal e cutânea em felino – Relato de caso. **Rev Cient de med Vet – Peq Animais e Animais de Estimação**. V.2,n.5,p.33-7,2004.

REOLON, A.; PEREZ. L. R. R. & MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Bras. de Patol e Med Lab**. V.40,n.5,2004.

ROSEMBAUM, R.; GONÇALVES, A. J.; WANKE, B. CAIUBY, M.J. CLEMENTE, H. L.; LAZERA, M.D.S. MONTENEGRO, P.C.F. &LONDERO, A.T. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of criptococcosis in Brazil. **Mycopathologia**. V.119, p.133-6,1992.

ROSEMBAUM, R. & GONÇALVES, A. J. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. **Clin. Infect. Dis**. V.18,p.369-80,1994.

RUBINSTEIN, H.; MARFICORENA, B.; MASIH, D.; BORLETTO, N.; VEJA, R.; VARENGO, H.; NEGRONI, R. Isolation of human fungi from sil and identification of two endemic áreas of *Cryptococcus neoformans* and *coccidioides immitis*. **Rev. Inst. Med. Trop**. São Paulo., v.31,p.1-6, 1989.

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

SÁ, A. C. M.; ROZEMFELD, A. C.; MOURA-NETO, V.; SOUZA, W. & ROZENTAL, S. Estudo da interação do fungo *Cryptococcus neoformans* com células microgliais. In: do IV Congresso Brasileiro de Micologia, **Anais...** Ouro Preto-MG, 2004. p.56.

SANTAGELO, R. T.; NOURI-SORHABI, M. H.; SORRELL, T. C.; CAGNEY, M.; CHEN, S. C.; KUCHEL, P. W. & WRIGHT, L. C. Biochemical and functional characterization of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. **J. Med. Microbiol.**, v.8,p.731-40, 1999.

SANT'ANA, F. J. F.; MAIA, F. C. L.; GOMES FILHO, J. B.; SILVEIRA, A. B. & SILVA, V. R. Criptococose em felino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** V.51,n.4,p.333-34, 1999.

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

SHADOMY, H.J. & UTZ, J.P. Preliminary studies on a hypha – forming mutant of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v.58,p.383 -90, 1996.

SILVA, M. E. & PAULA, L. A. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excrementos e ninhos de pombos em Salvador, Bahia (Brasil). **Rev Inst Med Trop São Paulo**. V.5,p.9-11, 1963.

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

SILVA, E. G.; BARONI, F. A.; AULER, M.E.; CHANG, M.; DIAS, A. L. T.; MELHEM, M. C.; SZESZS, M. W.; CURY, A. E.; RIVERA, I. N. G.; L.; GAMBALE, W. & PAULA, C. R. Production of proteinase and susceptibility to fluconazole in *Cryptococcus neoformans*: a new parameter to be investigated. In: 6th International Conference on *Cryptococcus* & *Cryptococcosis*. **Anais...** Boston, Massachusetts, USA. 2005.

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

SIMON, G.; SIMON, G.; ERDÓS, M. & MARÔDI, L.. Invasive *Cryptococcus laurentii* disease in a nine-year-old boy with wiskott-aldrich-linked hyper-immunoglobulin M syndrome. **Ped Inf Dis J**. V.24,n.10,p.935-37,2005.

SOARES, A. C. B.; PAULA, C. R.; DIAS, A. L. T.; CASEIRO, M. M. & COSTA, S. O. P. Environmental Strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Rev Inst Med Trop de São Paulo**. V.47,n.1,2005.

SORREL, T. C.; CHEN, S. C. A.; RUMA, P.; MEYER, W.; PFEIFFER, T. J.; ELLIS, D. H. & BROWNLEE, A. G. Concordance of Clinical and Environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *Gattii* by Random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. **Journal of Clin Microbiol**. V.34,n.5,p.1253-60,1996.

SORREL, T.; CHEN, S.; NIMMO, G.; SPEED, B.; CURRIE.; ELLIS, D.; MARRIOT, D. & PARR, D. Australian cryptococcal study group. Cryptococcosis in Australia: The Australian cryptococcal study group and new diagnostic approaches. In: International Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis. 1999. **Abstracts**, p.26.

STEPHEN, C. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. **Can Vet j**. V.43,p.792-4,2002.

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

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

SWINE-DESGAIN, D.; DEPPNER, M.; MANIRATUNGA, S.; LAROCHE, R.; FLOCH, J. J. & KADENDE, P. AIDS – associated cryptococcosis in Bujumbura, Burundi: an epidemiological study. **J. Med. Vet Mycol.**, v.29,p.25-30, 1991.

TICHES, D.; VITE, C. H., DAYRELL-HART, B.; STEIBERG, S. A., GROSS, S. & LEXA, F. A case of canine central nervous system cryptococcosis: management with fluconazole. **J Am Anim Hosp Assoc**. V.34,n.2,p.145-51,1998.

VIDOTTO, V.; SINICCO, A.; DI FARIA, D.; CARDAROPOLI, S.; AOKI, S. & ITO-KUWA, S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v.136,p.119-23, 1996.

VIDOTTO, V.; LEONE, R.; SINICCO, A.; ITO-KUWA, S. & CRISEO, G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. **Mycopathologia**, v.142,p. 71-6, 1998.

VIDOTTO, V.; MELHEM, M.; PUKINSKAS, S.; AOK, S.; CARRARA, C. & POGLIESE, A. Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS Patients in Brazil. **Rev Iberoam Micol**. V.22,p.29-33, 2005.

VIEIRA, L. S.; CARVALHO, V. G.; FRANCO, M. C. SIQUEIRA. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pássaros cativos e de rações para aves,

comercializados em “Pet shops” na cidade de Alfenas, MG. In: do IV Congresso Brasileiro de Micologia, **Anais...** Ouro Preto-MG, 2004. p.56.

WATT, D. A. A case of cryptococcal granuloma in the nasal cavity of a horse. **Austr. Vet. J.**, v.46,p.493-5, 1970.

WILSON, D. E.; BENNETT, J. E. & BAILEY, J. W. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Proc Soc. Exp. Biol. Med.** V.127,p. 820-3, 1968.

ANEXOS

Anexo 1 - Solução salina com cloranfenicol

Anexo 2 – Meio Sabouraud dextrose a 4 %

Anexo 3 – Meio contendo dopamina

Anexo 4- Meio Christensen

Anexo 5 – Meio CGB

Anexo 6 –Meio YEPD modificado

Anexo 7 – Meio de fosfolipase

Anexo 8 – Ficha de identificação de leveduras

Anexo 1- Solução salina com cloranfenicol 200 mg/l

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

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

Anexo 2 – Meio Sabouraud dextrose a 4%

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

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

Anexo 3 – Meio contendo dopamina

Para 1,0 Litro de água destilada

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

Filtração

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

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

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

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

Anexo 4- Meio de Christensen

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

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

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

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

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

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

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

Solução estoque B (ágar base com azul de bromotimol)

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

Solução de uso

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

Anexo 6 – Meio YEPD modificado

Extrato de levedura	0,55 %
Peptona	1,0 %
Glicose	2,0 %
Agar	2,0 %
Água destilada	100 mL

Anexo 7- Meio para fosfolipase

Preparação de gema de ovo

Gema de ovo _____ 80,0 g

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

Meio agar fosfolipase

Agar Sabouraud dextrose.....	65,0g
NaCl.....	57,3g
CaCl3.....	0,55g
Água destilada.....	1000 mL

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

Anexo 8 – Protocolo de identificação de leveduras

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

PROCEDÊNCIA : _____ REGISTRO : _____

OBSERVAÇÕES :

1- EXAME DIRETO :

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

3- MICROCULTIVO E TUBO GERMINATIVO :

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

4- ASCOS E ASCOSPÓROS :
 POSITIVOS :

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

6- AUXANOGRAMA

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

7- ZIMOGRAMA

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

IDENTIFICAÇÃO :

