

Estudo dos nichos ecológicos de leveduras patogênicas das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* na cidade de Londrina, PR

Study of ecological niches from pathogenic yeasts of the species *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Londrina City, PR

Aline Artioli Machado Yamamura^{1*}; Roberta Lemos Freire²;
Milton Hissashi Yamamura³; Aline Felix⁴; Alessandra Taroda⁵

Resumo

Os fungos patogênicos das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* podem ser encontrados no meio ambiente em guano de pombos, solo com excrementos de pombos e pássaros, além de matéria vegetal de árvores. O objetivo deste estudo foi investigar a presença das espécies patogênicas de *Cryptococcus* em solo com excrementos de pombos, solo com matéria vegetal e em madeira em decomposição de partes ocas de árvores existentes em lugares públicos da cidade de Londrina, PR. Trinta locais foram selecionados dentre praças, parques e ruas da região central da cidade onde amostras foram coletadas de: solo com excretas de pombos (n=120), solo com matéria vegetal da base das árvores (n=120) e *swab* de matéria vegetal em decomposição de partes ocas de árvores, no período de junho de 2009 a março de 2010. As coletas abrangeram três estações do ano: inverno, primavera e verão, nesse período 360 amostras foram obtidas e analisadas em quatro diferentes etapas. As espécies foram identificadas por meio de análise microscópica da cultura e crescimento em meios seletivos. Um total de cinco amostras foi positivo para *Cryptococcus* spp. (1,38%), três amostras foram identificadas como *C. neoformans* (0,84%), duas amostras de solo com excrementos de pombos e uma amostra vegetal do solo. As amostras eram provenientes de um parque, uma rua e uma praça localizados na área central de Londrina. *C. gattii* foi isolado das outras duas amostras (0,54%), uma em solo com excrementos de pombos e outra em amostra de matéria vegetal do solo obtida de dois parques da cidade localizados em área desprotegida contra insolação e chuvas. Não foi obtido isolamento de *Cryptococcus* spp. das 120 amostras de *swab* de madeira em decomposição de partes ocas das 12 espécies de árvores amostradas. Os resultados das análises do meio ambiente confirmaram a ocorrência das espécies patogênicas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* em locais onde a população suscetível de humanos e animais podem ser expostos aos propágulos infecciosos dos fungos.

Palavras-chave: Pombos, leveduras, ecologia dos fungos, *Cryptococcus* spp., Criptococose

¹ Prof^a. de Microbiologia Veterinária, Dept^o de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, UEL, Londrina, PR. E-mail: alineartioli@uel.br

² Prof^a. de Epidemiologia Aplicada à Medicina Veterinária, Dept^o de Medicina Veterinária Preventiva, UEL/CCA, Londrina, PR. E-mail: rlfreire@uel.br

³ Prof. de Parasitologia Veterinária, Dept^o de Medicina Veterinária Preventiva, UEL/CCA, Londrina, PR. E-mail: yamamura@uel.br

⁴ Especialização em Residência de Moléstias Infecciosas, Dept^o de Medicina Veterinária Preventiva, UEL/CCA, Londrina, PR. E-mail: alinefelix.lih@hotmail.com

⁵ Especialização em Residência de Moléstias Parasitárias, Dept^o de Medicina Veterinária Preventiva, UEL/CCA, Londrina, PR. E-mail: ataroda@terra.com.br

* Autor para correspondência

Abstract

The pathogenic fungi of the species *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* could be found in the environment on pigeon guano, soil with pigeon and bird excreta and vegetable material from trees. The aim of this study was analyze the presence of the *Cryptococcus* pathogenic species on soil with pigeon excreta, soil with vegetable material and decayed wood of trunk hollows of trees from public places in the city of Londrina, PR. Thirty public places were selected from squares, parks and streets in the city centre where samples were collected from: soil with pigeon excreta (n=120), soil with vegetable material (n=120) and decayed wood of trunk hollows of trees (n=120), during June 2009 until March 2010. These collect comprised the seasons: winter, spring and summer, during this period 360 samples were obtained and analyzed in four different times. The species were identified by means of microscopic analysis from culture and their rising on selective medium. A total of five samples were positive to *Cryptococcus* spp. (1,38%) three were positive to *Cryptococcus neoformans* (0,84%) in two samples of soil with pigeon excreta, the other one on soil with vegetable material. The samples were originated from a park, a street and a square, placed in the city centre area of Londrina. *Cryptococcus gattii* was isolated from two samples (0,54%), one in soil with pigeon excreta and another in vegetable material obtained from the soil of two parks that were not protected against sunshine and rain. *Cryptococcus* spp. was not isolated in none of the 120 swabs samples of decayed wood trunk hollows from the 12 species of trees sampled. The results of the analyses from the environment confirmed the occurrence of the pathogenic species *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* in places where the human and animal susceptible populations could be exposure to infectious fungi propagators.

Key words: Pigeon, yeasts, fungi ecology, *Cryptococcus* spp., Cryptococcosis

Introdução

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são fungos patogênicos que causam doença em várias espécies animais, incluindo mamíferos placentários terrestres, marsupiais, cetáceos, aves e répteis. Estas espécies de *Cryptococcus* causam a criptococose doença fúngica oportunista, localizada ou disseminada, que atinge os pulmões tornando-se muitas vezes fatal em humanos, principalmente, quando afeta o sistema nervoso central (KWON-CHUNG et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

Historicamente, *C. neoformans* (Sanfelice) Vuillemin, 1901, foi classificado em duas variedades e cinco sorotipos: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e, *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). Devido à evidência molecular (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999; BOEKHOUT et al., 2001) passou-se a adotar a nomenclatura revisada e atualizada por Kwon-Chung et al. (2002). As leveduras foram re-classificadas como duas espécies, *C. neoformans* e *C. gattii* (KWON-CHUNG et al., 2002) que diferem quanto à

epidemiologia, apresentação clínica e terapêutica (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; SPEED; DUNT, 1995; SORREL, 2001). O agente patogênico predominantemente oportunista *C. neoformans* possui duas variedades *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipos A e AD) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e o agente patogênico primário *C. gattii* (sorotipos B e C) com base em análises dos padrões genéticos do DNA (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999).

C. neoformans é cosmopolita, do ponto de vista epidemiológico, enquanto *C. gattii* é limitado a certas regiões tropicais. A criptococose é adquirida pela inalação de propágulos infecciosos a partir de uma fonte ambiental. *C. neoformans* é encontrado na natureza, geralmente em fezes de pombos, outras aves e em árvores, pode viver saprofiticamente no organismo de humanos e dos animais domésticos e silvestres (criptococose-infecção) (ELLIS; PFEIFFER, 1990; LAZÉRA et al., 1996). *C. gattii* encontra-se presente em folhas, partes ocas do tronco e madeira em decomposição de árvores pertencentes às espécies australianas *Eucalyptus camaldulensis* e *E. tereticornis*, além de árvores nativas de

espécies existentes em regiões dos continentes de clima tropical e subtropical (SORREL, 2001; RANDHAWA; KOWSHIK; KHAN, 2003). As diferentes características epidemiológicas dos fungos das espécies patogênicas do gênero *Cryptococcus* determinam seja necessário o estudo do *habitat*, das variações sazonais em relação à produção de propágulos infecciosos e das vias de transmissão, desse modo medidas de profilaxia e controle da infecção poderão ser desenvolvidas para humanos e animais (RESTREPO et al., 2000).

O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de fungos das espécies patogênicas de *Cryptococcus* em seu *habitat* ou nicho ecológico no meio ambiente dos lugares públicos da cidade de Londrina, PR, por meio da pesquisa do solo com excrementos de pombos, solo com matéria vegetal de árvores e madeira em decomposição do tronco de árvores.

Material e Métodos

A área de estudo, localização geográfica e condições climáticas do município de Londrina correspondem aos seguintes dados: 23°08'47''S e 23°35'08''S de latitude e longitude 50°59'50''W e 50°55'49''W, altitude máxima 690 m, altitude mínima 425 m acima do nível do mar, clima subtropical úmido com chuvas em todas as estações, temperatura média anual de 21°C, temperatura média máxima de 27,6°C, temperatura média mínima de 15,8°C e índices de umidade relativa do ar média anual de 70-75% (PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE LONDRINA, 2010).

O tamanho de amostra para a população alvo a ser estudada foi determinado utilizando-se o pacote estatístico EPI6 (CDC – Atlanta). Para uma população infinita, adotou-se a prevalência esperada de 50%, erro de 5% e nível de significância de 5%, resultando em 360 amostras. A adoção de 50% de prevalência esperada é uma prática comum quando não há estudos que demonstrem a prevalência na região, dessa forma minimiza-se o erro de

amostragem e garante-se a precisão da pesquisa.

A região central da cidade de Londrina e os bairros contíguos possuem arborização em todas as ruas e praças, fato que permite o assentamento de pombos e conseqüente queda e acúmulo dos excrementos em calçadas e ruas. Dentro dessa área foram selecionados 30 locais protegidos e não protegidos (ruas, parques e praças) altamente contaminados com dejetos de pombos e próximos a ruas movimentadas ou a um fluxo significativo de pessoas. No período de Junho de 2009 a Março de 2010 foram colhidas e analisadas 360 amostras dos 30 locais selecionados, da seguinte forma: 30 locais x três unidades amostrais x quatro ciclos de coleta. A unidade de amostragem consistiu de: (i) *Swabs* de matéria vegetal existente na madeira em decomposição de partes ocas do tronco de árvores (n=120), (ii) solo com excrementos de pombos (n=120), e (iii) matéria vegetal presente no solo da base das árvores (detritos de folhas e madeira de árvores) (n=120).

As amostras de solo com excrementos de pombos e com matéria vegetal foram colhidas utilizando-se espátulas estéreis individuais e acondicionadas em placas de petri esterilizadas, em duplicata, e em quantidade aproximada de 4,0 a 20 g (MONTENEGRO; PAULA, 2000). As amostras (*swabs* e amostras de solo) foram transportadas em caixas isotérmicas, mantidas a 4°C, processadas e analisadas no Laboratório de Micologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina.

Os *swabs* das amostras foram processados num período de duas horas após a coleta, da seguinte forma: 10 ml de solução fisiológica estéril contendo gentamicina (25 mg/l) foram adicionados em cada tubo de ensaio contendo um *swab*, seguido de turbilhonamento por 2 minutos em agitadora, após o descarte dos *swabs* a suspensão do conteúdo dos tubos foi retirada após sedimentação por 30 minutos e alíquotas de 100 µl foram semeadas em placas de agar Sabouraud dextrose, incubadas em temperatura de 32°C, num período de dez dias até a formação de

colônias e o exame microscópico (RANDHAWA; KOWSHIK; KHAN, 2005).

As amostras do solo com detritos da matéria vegetal e excrementos de pombos foram processadas em 48 horas após a coleta. Foram adicionados 30 ml de solução salina esterilizada com adição de cloranfenicol e ampicilina (150 mg/ml cada) a 2,0 g de cada um dos tipos de amostras. Após homogeneização, cada uma das amostras foi filtrada em gaze esterilizada e uma alíquota de 100 µl semeada em ágar Sabouraud dextrose. As culturas foram incubadas a 35°C e examinadas diariamente durante 21 dias (MONTENEGRO; PAULA, 2000; RIBEIRO et al., 2006).

A identificação do gênero *Cryptococcus* teve como base a morfologia macroscópica das colônias com aspecto leveduriforme em ágar Sabouraud dextrose, o isolamento seletivo em meio de Staib ou ágar semente de niger (*Guizotia abyssinica*), a morfologia microscópica pela coloração com tinta nanquim e o teste de uréase (LACAZ et al., 1998). Para a identificação das espécies foi utilizado teste de crescimento em ágar CGB (canavanina-glicina-azul-de-bromotimol) (LACAZ et al., 1998; MELO; LACAZ; CHARBELL, 1993; RIBEIRO et al., 2006).

Resultados e Discussão

Das 360 amostras analisadas cinco (1,38%) foram positivas para *Cryptococcus* spp.. Destas, três amostras (0,84%) apresentaram *C. neoformans*, duas em solo com excrementos de pombos e uma em solo com material vegetal das árvores; provenientes de parque, praça e rua (Figura 1). Leveduras do gênero *Candida* também foram isoladas nessas amostras

(Tabela 1). *C. gattii* foi isolado em duas amostras (0,54%), uma de solo com excrementos de pombos e outra de solo com matéria vegetal e provinham de dois parques públicos, nominados “Zerão” e “Bosque” (Tabela 1; Figura 1). As duas amostras foram colhidas de áreas desprotegidas, expostas a radiação solar e chuvas constantes, em locais de elevada passagem de transeuntes. Conforme observado, na maioria das praças visitadas havia número elevado de pombos e dejetos e em consequência havia precárias condições de higiene.

As árvores encontradas na região pesquisada pertencem às espécies: *Bauhinia forficata*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus tereticornis*, *Lagerstoeimia indica*, *Allophylus edulis*, *Ocatea pulchella*, *Schinus terebinthifolia*, *Ceasalpinea peltophoroides*, *Ligusticum japonicum*, *Ficus microcarpa*, *Gurucaia* sp, *Moquilea tomentosa*. As árvores de maior porte representadas por *Eucalyptus* sp localizavam-se nos parques e as demais nas ruas e praças. Não houve positividade em nenhuma das 120 amostras de *swab* da madeira em decomposição de partes ocas do tronco de árvores (Tabela 1).

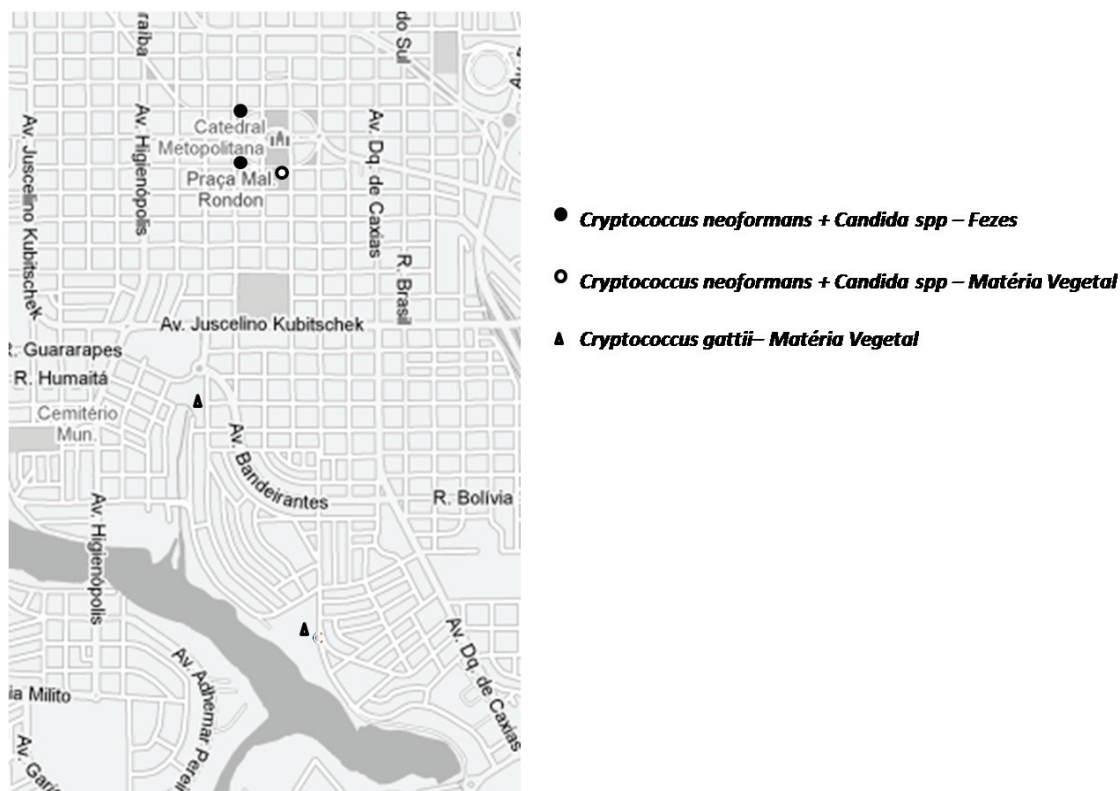
Os excrementos de aves têm sido associados ao *C. neoformans* em muitos estudos (CURRIE; FREUNDLICH, CASADEVALL, 1994; YAMAMOTO et al., 1995; VARMA et al., 1995; FRANZOT et al., 1997; DELGADO et al., 2005). *C. neoformans* tem uma distribuição mundial, tendo sido isolado de várias origens na natureza. É conhecido por sua associação com dejetos de pombos, porém o fungo pode ser encontrado em excretas de várias aves, tais como psitacídeos, passeriformes, columbiformes e falconiformes (CAFARCHIA et al., 2006), no solo, na madeira em decomposição e em vegetais e frutas.

Tabela 1. Resultados de culturas fúngicas em 360 amostras de solo com excrementos de pombos, solo com material vegetal e *swab* de partes ocas de árvores, colhidos em 30 locais centrais da cidade de Londrina, PR, de junho de 2009 a março de 2010.

Amostras	Positivos/Total (%)	Fungos		
		<i>Cryptococcus neoformans</i> nº positivos	<i>Cryptococcus gattii</i> nº positivos	<i>Candida</i> spp nº positivos
Solo com Excrementos	2/120 (0,54)	2	0	2
Solo com material vegetal	3/120 (0,84)	1	2	1
<i>Swab</i>	0/120 (0,00)	0	0	0
Total	5/360 (1,38)	3	2	3

Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 1. Locais onde foram isolados *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* em amostras de solo com excretas de pombos e com matéria vegetal, na região central da cidade de Londrina, Paraná, 2009 – 2010.



Fonte: Elaboração dos autores.

Centro da cidade de Londrina. Disponível em: <[https://www. Google/gps](https://www.google/gps)>

No Brasil foram pesquisados locais públicos, praças e parques do centro da cidade de São Paulo obtendo-se o isolamento de *C. neoformans* em 26,3% das amostras de excrementos de pombos

com freqüência maior em locais protegidos do que desprotegidos (MONTENEGRO; PAULA, 2000). Locais desprotegidos favorecem a dessecação de excretas, porém *C. neoformans* é altamente

resistente à dessecação. Esta característica favorece a sobrevivência do fungo quando ocorre a competição com outras populações microbianas presentes nos excrementos dos pombos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). A levedura seca, forma infectante, é facilmente propagada pelo ar (MITCHELL; PERFECT, 1995) e os excrementos de pombos com a presença de *C. neoformans* atuam como uma via natural de disseminação do fungo. Inversamente, em locais abertos e expostos raramente há a presença de *C. neoformans*, mesmo quando há grande acúmulo de excrementos de pombos. Esta espécie de fungo apresenta baixa tolerância térmica, sendo muito suscetível à radiação solar. Esses fatores, possivelmente, limitam o desenvolvimento da levedura em excrementos de pombos de locais desprotegidos (ISHAQ; BULMER; FELTON, 1968; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Pesquisas dirigidas para matéria vegetal como previamente sugerido por Staib et al. (1972) e Bauwens et al. (1986) conduziram a novos achados ambientais que permitiram esclarecer a complexa ecologia de *C. gattii*. O papel que as árvores desempenhavam no ciclo de vida de *C. gattii* era pouco conhecido até que em 1990, Ellis e Pfeiffer, em estudo epidemiológico observaram a associação entre *C. gattii* sorotipo B e eucaliptos na Austrália, estabelecendo associação do nicho ecológico com: madeira em decomposição da base dos troncos de *E. camaldulensis*, folhas, flores onde os basidiósporos da fase sexuada são considerados propágulos infectantes dispersos no mesmo período de floração das árvores durante a primavera. Embora as espécies do Gênero *Cryptococcus* que pertencem ao Filo *Basidiomycotina* sejam encontradas no meio ambiente sob a forma sexuada de basidiósporos, nos tecidos dos hospedeiros esses microrganismos existem, exclusivamente, como leveduras encapsuladas com característica morfológica definida. Em consequência da distribuição da doença em humanos estar correlacionada, no início dos anos 1990, com os eucaliptos hospedeiros, a ampla pesquisa realizada pelos autores, acima citados,

elaborou uma proposta de ligação epidemiológica entre as espécies de eucaliptos hospedeiras e a infecção humana causada por *Cryptococcus gattii*. Evidenciada pela alta incidência de colonização do vestíbulo nasal de coalas, animais da fauna da Austrália, com *Cryptococcus gattii*, pois as folhas de *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* constituem numa fonte de alimento preferido desses animais e o tipo molecular isolado de eucaliptos corresponde ao isolado obtido de coalas, dos locais de colonização e/ou infecção, tais como: vestíbulo nasal, garras e pele (ELLIS; PFEIFFER, 1990).

Pesquisas confirmaram que além dos eucaliptos as árvores nativas de outros países poderiam ser consideradas reservatórios de *C. gattii* nas espécies existentes em regiões dos continentes de clima tropical e subtropical, tais como: *Cassia grandis*, *Ficus microcarpa*, *Syzygium jambolana*, *Syzygium cumini*, *Terminalia catappa* e *Senna multijuga* ((PFEIFFER; ELLIS, 1991; SORREL, 2001; RANDHAWA; KOWSHIK; KHAN, 2003). Devido à exportação comercial de *Eucalyptus camaldulensis* e *E. tereticornis* da Austrália, durante décadas, sendo que as espécies de eucaliptos têm sido estabelecidas em muitos países e regiões do globo terrestre, tais como: Estados Unidos (Havaí Califórnia.), sudoeste da Europa, região mediterrânea, subcontinente indiano, Américas do Sul e Central (Brasil, México), África (regiões central, sudoeste, sul), China e Papua Nova Guiné (SORREL, 2001). *C. gattii* sorotipo B e *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) costumam ser isoladas de flores e tronco de eucaliptos em diferentes regiões da Índia e de madeira em decomposição de troncos de árvores da espécie *Syzygium cumini* no noroeste da Índia (GUGNANI et al., 2005; RANDHAWA et al., 2006). Os estudos ambientais no Brasil tiveram início na região sudeste na cidade do Rio de Janeiro, em zona urbana, onde as amostras foram coletadas de madeira em decomposição do interior das partes ocas de troncos das árvores selecionadas (LAZÉRA; WANKE; NISHIKAWA, 1993; LAZÉRA et al., 1996). Nesses estudos foi isolado *C. gattii* em

oito (25,8%) de 31 espécies de árvores, tais como: ameixa de Java (*Sygygium jambolanum*), nativa da Índia e Brasil; chuva de novembro (*Senna multijuga*) proveniente da mata Atlântica; figueira (*Ficus microcarpa*) originária da Malásia, Índia e China, mas amplamente plantada como árvore ornamental; e chuva cor de rosa (*Cassia grandis*), nativa das florestas amazônicas do Brasil e de países vizinhos. As últimas três espécies foram adaptadas às zonas ambientais urbana e rural, abrangendo áreas do norte ao sudeste do Brasil. Na cidade de São Paulo, parque Ibirapuera, análise da sazonalidade de *Cryptococcus gattii* revelou a presença de propágulos de *C.gattii* durante o período de floração de *Eucalyptus camaldulensis* em duas ocasiões em dois anos nos meses de novembro, em uma das árvores nativas (*Caesalpinia peltophoroides*) originária da Mata Atlântica e denominada “sibipiruna”, em linguagem indígena, foi isolado *C.gattii* (MONTENEGRO; PAULA, 2000).

C. gattii foi isolado de amostras obtidas de partes ocas de árvores vivas: Oitis ou “árvore de chuva cor de rosa” (*Moquilea tomentosa*); Cássia (*Cassia grandis*) e Figueira (*Ficus microcarpa*), de restos de madeira, flores e folhas de *Eucalyptus camaldulensis*, em uma praça no campo da EMBRAPA localizado na cidade de Teresina, estado do Piauí, região nordeste do Brasil (LAZÉRA et al., 1998). Em região endêmica do nordeste do Brasil foram isolados *C. neoformans* e *C. gattii* em seis (18,5%) das amostras obtidas de 32 árvores analisadas do *habitat* natural de *C.gattii* em madeira em decomposição de partes ocas de árvores vivas (LAZÉRA et al., 2000). Em áreas urbanas e rurais no nordeste do Brasil, *C. gattii* foi identificado em árvores das espécies *Moquilea tomentosa*, *Ficus microcarpa* e *Cassia grandis* e na região norte, floresta amazônica, foram isolados *C. gattii* e *C. neoformans* de árvores das espécies *Miroxylon peruiiferum* e *Theobroma cacao* (RESTREPO et al., 2000). O primeiro relato de isolamento de *C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo D de árvores do gênero *Eucalyptus* ocorreu no estado do Rio

Grande do Sul, no Brasil, onde a maioria dos isolados estão relacionados a *C. gattii* do sorotipo B (RIBEIRO et al., 2006). Enquanto a maioria dos isolados ambientais de *C. gattii* têm sido originados de eucaliptos, na América do Sul, o sorotipo B foi encontrado no Brasil em nichos ambientais distintos daqueles estabelecidos, tais como: (i) ninho de vespas, no Uruguai; (ii) excremento de morcegos encontrado numa casa velha e, (iii) em madeira em decomposição do tronco de *Moquilea tomentosa*, no Brasil (SORREL, 2001).

Amostras positivas têm sido obtidas de eucaliptos das espécies *E. blakelyi*, *E. rudis* (grupo *red gum*) encontradas na Índia, nos EUA, no Brasil e na Itália (ELLIS; PFEIFFER, 1994; CHAKRABARTI et al., 1997; MONTAGNA et al., 1997; MONTENEGRO; PAULA, 2000). No entanto, casos de criptococose têm sido relatados em países onde os eucaliptos não tenham se adaptado bem ou não sejam endêmicos, por exemplo, na Malásia. Além disso, mesmo com a existência de extensa pesquisa de amostragem ambiental, *C. gattii* não tem sido isolado de material de eucalipto em áreas com infecção endêmica, incluindo África Central, África do Sul e Papua Nova Guiné (SORREL, 2001).

A prevalência de criptococose causada por *C. gattii* é elevada em localizações restritas, geograficamente, às áreas tropicais e subtropicais, incluindo: Austrália, Brasil, Camboja, Havaí, sul do estado da Califórnia (EUA), México, Paraguai, Tailândia, Vietnam, Nepal e África Central. Nessas áreas *C. gattii* apresentou mais de 35% dos isolados que correspondiam ao sorotipo B, exceto no sul do estado da Califórnia (EUA), onde 11 casos de 30 pertenciam ao sorotipo C (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984). *C. gattii* é predominantemente patogênico, pode ser observado em pacientes sem imunossupressão aparente e poucos casos têm sido descritos em pacientes com AIDS, no Brasil (MELO; LACAZ; CHARBELL, 1993; ROZENBAUM; RIOS-GONÇALVES, 1994; MONTENEGRO; PAULA, 2000). As infecções causadas por *C. gattii* requerem tratamento

agressivo e prolongado e são mais refratárias à quimioterapia antifúngica (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; SPEED; DUNT, 1995; SORREL, 2001). Por outro lado a incidência de *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* tem aumentado, continuamente, devido ao crescente uso de medicamentos imunossupressores e à epidemia de AIDS, sendo considerada a segunda causa de infecção oportunista mais comum (MELO; LACAZ; CHARBELL, 1993; BUCHANAN; MURPHY, 1998; FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999).

Na cidade de São Paulo, a criptococose causada por *C. neoformans* é a manifestação presente em 6,7% dos pacientes com AIDS (MONTENEGRO; PAULA, 2000). No Brasil, de acordo com dados oficiais, 4,5% das infecções oportunistas relacionadas com AIDS são causadas por *C. neoformans* e *C. gattii* e reconhecidos como agentes etiológicos de criptococose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). A criptococose sistêmica é considerada endêmica na região nordeste do país, *C. gattii* sorotipo B foi diagnosticado em 71,1% a 75% dos pacientes com neurocriptococose e *C. neoformans* em 28,9% dos casos (CAVALCANTI, 1997; LAZÉRA et al., 2000; NISHIKAWA et al., 2003). No estado do Rio Grande do Sul entre os anos de 2000 a 2004 havia 394 casos de criptococose registrados (SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL, 2005).

O município de Londrina está localizado no norte do Estado do Paraná e, segundo o censo 2010, apresenta 506.701 habitantes. A ocorrência de criptococose apresentou um aumento do número de casos em humanos e em animais das espécies canina e felina, em Londrina e em outras cidades do Paraná, nos últimos oito anos. A criptococose não é considerada doença de notificação obrigatória pelo Ministério da Saúde, portanto, inexistem dados estatísticos sobre sua incidência (JORNAL DE LONDRINA, 2007; 2008b; 2008c; 2009b). Este

estudo é o primeiro elaborado no município de Londrina onde há relatos efetuados pela imprensa local de casos de criptococose em humanos, porém, não foi possível obter os registros dos óbitos relacionados com a criptococose sistêmica (JORNAL DE LONDRINA, 2007; 2008a; 2008b; 2008c; 2009a; 2009b). Em humanos a AIDS é considerada doença com causa *mortis* de notificação obrigatória e quando a criptococose está associada a AIDS esse registro fica vinculado à doença de base. Nos últimos anos a população de pombos aumentou, consideravelmente, na cidade de Londrina devido à oferta de alimento, abrigo e falta de predadores naturais. A presença dessas aves e a falta de remoção adequada desses excrementos resultaram com o passar do tempo em acúmulo intermitente no meio ambiente urbano (JORNAL DE LONDRINA, 2008a; 2009b).

No Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, PR, há registros de casos de criptococose sistêmica em animais domésticos representados por: cães, gatos e avestruzes, consideradas aves exóticas no Brasil (YAMAMURA et al., 2003).

Conclusão

Os fungos patogênicos das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* foram isolados do meio ambiente representado pelo solo de locais em que há grande movimentação de transeuntes na região central da cidade de Londrina, como parques, praças e ruas. Esses fungos foram isolados do solo com excrementos de pombos e matéria vegetal próxima às árvores em locais desabrigados e expostos a chuvas constantes e luz solar. Os resultados das análises do meio ambiente confirmaram a ocorrência das espécies patogênicas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* nos ambientes onde humanos e animais podem ficar expostos aos propágulos dos fungos provenientes dos nichos ambientais.

Agradecimentos

Agradecemos à funcionária técnica do Laboratório de Micologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Eliana Célia Pereira, pelo processamento das amostras e preparo das culturas micológicas. Agradecemos à Universidade Estadual de Londrina por possibilitar o meio de transporte adequado para a colheita das amostras em locais públicos da cidade de Londrina, PR.

Referências

- BAUWENS, L.; SWINNE, D.; De ROEY, C. de; De MEURICH, W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in aviaries of the Antwerp Zoological Garden. *Mycosen*, Berlim, v. 29, n. 1, p. 291-294, 1986.
- BOEKHOUT, T.; THEELAN, B.; DIAZ, M.; FELL, J. W.; HOP, W. C. J.; ABEL, E. C. A.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, v. 147, n. 4, p. 891-907, 2001.
- BUCHANAN, K. L.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, n. 1, p. 1-15, 1998.
- CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; IATTA, R.; CAMARDA, M.; MONTAGNA, M. T.; OTRANTO, D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. *Medical Mycology*, Abingdon, v. 44, n. 6, p. 485-492, 2006.
- CAVALCANTI, M. A. S. *Criptococose e seu agente no Meio Norte, estados do Piauí e Maranhão, Brasil*. 1997. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Fundação Instituto Oswaldo Cruz. Universidade Federal do Piauí, Piauí.
- CHAKRABARTI, A.; JATANA, M.; KUMAR, P.; CHATA, L.; KAUSHAL, A.; PADHYE, A. A. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 35, n. 12, p. 3340-3342, 1997.
- CURRIE, B. P.; FREUNDLICH, L. F.; CASADEVALL, A. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 32, n. 5, p. 1188-1192, 1994.
- DELGADO, A. C.; TAGUCHI, H.; MIKAMI, Y.; MYIAJY, M.; VILLARES, M. C. B. Human Cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. *Mycopathologia*, Netherlands, v. 159, n. 1, p. 7-11, 2005.
- ELLIS, D.; PFEIFFER, T. Cryptococcosis and the ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Japanese Journal of Medical Mycology*, v. 35, n. 1, p. 111-122, 1994.
- _____. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 28, n. 7, p. 1642-1644, 1990.
- FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S.; CURRIE, B. P.; CASDEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 35, n. 9, p. 2243-2251, 1997.
- FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 37, n. 3, p. 838-840, 1999.
- GUGNANI, H. C.; MITCHELL, T. G.; LITVINTSEVA, A. P.; LENGELER, K. B.; HEITTMAN, J.; KUMAR, A.; BASU, S.; PALIWAL-JOSHI, A. Isolation of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from flowers and bark of *Eucalyptus* trees in India. *Medical Mycology*, Abingdon, v. 43, n. 6, p. 565-569, 2005.
- ISHAQ, C. M.; BULMER, G. S.; FELTON, F. G. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia and Mycology Applied*, v. 35, n. 1, p. 81-90, 1968.
- JORNAL DE LONDRINA. Saúde: UEL pesquisa fungos da criptococose. Londrina, p. 5, 18 de junho de 2009b.
- _____. Criptococose: secretário diz que não há como ligar óbito a fezes de pombo. Londrina, p. 5, 2 de junho de 2009a.
- _____. Não há solução para os pombos, diz SEMA. Londrina, p. 4, 15 de janeiro de 2008c.
- _____. Criptococose: paciente continua longe da cura. Londrina, p. 5, 13 de janeiro de 2008b.
- _____. Doença do pombo já fez nova vítima fatal em Londrina. Londrina, p.4, 13 de janeiro de 2008a.
- _____. Fezes de pombo deixam dois doentes na região. Londrina, p. 4, 18 de fevereiro de 2007.

- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Cryptococcosis. In: KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. *Medical mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p. 397-445.
- _____. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. *Zbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygienen*, v. 258, n. 2, p. 213-218, 1984.
- KWON-CHUNG, K. J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W.; DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurians* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomyces, Tremellomycetidae). *Taxon*, v. 51, n. 9, p. 804-806, 2002.
- KWON-CHUNG, K. J.; SORREL, T. C.; DROMER, F.; FUNG, E.; LEVITZ, S. M. Cryptococcosis: clinical and biological aspects. *Medical Mycology*, Abingdon, v. 38, p. 205-213, 2000. Suplemento 1.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. de. *Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico*. São Paulo: Sarvier, 1998. 445 p.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. de. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.
- LAZÉRA, M. S.; CAVALCANTI, M. A.; 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. *Medical Mycology*, Edinburgh, v. 36, n. 2, p. 119-122, 1998.
- LAZÉRA, M. S.; PIRES, F. D. A.; CAMELLO-COURA, L.; NISHIKAWA, M. M.; BEZERRA, C. C. F.; TRILLES, B. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *Journal of Medical Veterinary Mycology*, Edinburgh, v. 34, n. 2, p. 127-131, 1996.
- LAZÉRA, M. S.; SALMITO CAVALCANTI, M. A.; LONDERO, A. T.; TRILLES, B.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, Abingdon, v. 38, n. 5, p. 379-383, 2000.
- LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophyte sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Veterinary Mycology*, Abingdon, v. 31, n. 6, p. 449-454, 1993.
- MELO, N. T.; LACAZ, C. S.; CHARBEL, C. E. Quimiotipagem de *Cryptococcus neoformans*. Revisão de Literatura. Novos dados epidemiológicos sobre a criptococose. Nossa experiência com o emprego do meio de C.G.B. no estudo daquela levedura. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 469-478, 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa nacional de doenças sexualmente transmissíveis, Brasília, Brasil. *Boletim Epidemiológico de AIDS*, v. 1, n. 2, p. 44, 1999.
- MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS –100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995.
- MONTAGNA, M. T.; TORTORANO, A. M.; FIORE, L.; INGLETTI, A. M.; BARBUTI, S. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* em Itálie. Note I. Premier Casautochtone de meningite à sérotype B chez um sujet VIH positif. *Journal de Mycologie Médicale*, Paris, v. 7, n. 1, p. 9220-9225, 1997.
- MONTENEGRO, H.; PAULA, C. R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Medical Mycology*, Abingdon, v. 38, n. 5, p. 385-390, 2000.
- NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C. L.; BEZERRA, C. C. F.; PÉREZ, M. A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *Journal of Clinical and Microbiology*, Washington, v. 41, n. 1, p. 73-77, 2003.
- PFEIFFER, M.; ELLIS, D. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *Journal of Veterinary Mycology*, Abingdon, v. 30, n. 5, p. 407-408, 1992.
- PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE LONDRINA. Portal da prefeitura do município de Londrina – a cidade. Disponível em: <https://www.londrina.pr.gov.br/index>. Acesso em: 02 abr. 2010.
- RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; KHAN, Z. U. Decayed wood of *Syzygium cunini* and *Ficus religiosa* living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, Abingdon, v. 41, n. 3, p. 199-209, 2003.
- _____. Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* from decayed wood in tree trunk hollows. *Medical Mycology*, Abingdon, v. 43, n. 1, p. 67-71, 2005.

- RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; PREETI SINHA, K.; ANVRADHA CHOWDHARY; KHAN, Z. U. ZHUNYAN; JIANPING XU; AMIT KUMAR. Distribution of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in decayed trunk wood of *Syzygium cumini* trees in north-western India. *Medical Mycology*, Abingdon, v. 44, n. 7, p. 623-630, 2006.
- RESTREPO, A.; BAUMGARDNER, D. J.; BAGAGLI, E.; COOPER JR, C. R.; MCGINNIS, M. R.; LAZÉRA, M. S.; BARBOSA, F. H.; BOSCO, S. M. G.; ZOILO, Z. P. F. R.; COELHO, K. I. R.; FORTES, S. T.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; SANO, A.; WANKE, B. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Medical Mycology*, Abingdon, v. 38, p. 167-177, 2000. Suplemento 1.
- RIBEIRO, A. M.; SILVA, L. K. R. E.; SCHRANK, I. S.; SCHRANK, A.; MEYER, MEYER, W.; VAINSTEIN, M. H. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from Eucalypts in South Brazil. *Medical Mycology*, Abingdon, v. 44, n. 8, p. 707-713, 2006.
- ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A. J. R. Clinical epidemiological study of 171 cases of Cryptococcosis. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 18, n. 3, p. 369-380, 1994.
- SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL. Divisão de controle de doenças transmissíveis agudas. Porto Alegre, RS: [s. n], 2005. (Nota Epidemiológica).
- SORREL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Medical Mycology*, Abingdon, v. 39, n. 2, p. 155-168, 2001.
- SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 21, n. 1, p. 28-34, 1995.
- STAIB, F.; THIELKE, C.; RANDHAWA, H. S.; SENSKA, M.; KULINS, G. Colonization of dead plants by *Cryptococcus neoformans*. *Zbl bakt Hyg I Abt Orig A*, v. 225, n. 3, p. 113-124, 1972.
- VARMA, A.; SWINNE, D.; STAIB, F.; BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J. Diversity of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 33, n. 7, p. 1807-1814, 1995.
- YAMAMOTO, Y.; KOHNO, S.; KOGA, H.; HAKEYA, H.; TOMONO, K.; KAKU, M.; YAMAZAKI, T.; ARIZAWA, M.; IHARA, K. Random amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 33, n. 12, p. 3328-3332, 1995.
- YAMAMURA, A. A. M.; MAFFEI, M. C. L.; REIS, A. C. F.; TUBELIS, P.; COSENZA, M. Infecção pulmonar por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* em avestruz adulto (*Struthio camelus*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003. Florianópolis. *Anais...* Florianópolis [s.n], 2003. p. 225.

