Presença e susceptibilidade aos antifúngicos do Cryptococcus spp. *em excretas de pombos nos arredores dos grandes hospitais de Porto Alegre*

Presence and susceptibility to antifungal agents of Cryptococcus spp. *in the excreta of pigeons on the outskirts of large hospitals in Porto Alegre*

Adelina Mezzari[1], Adília Maria Pereira Wliebbelling[2], Guilherme Girardi May[3], Guilherme Carvalho Albé[3], Henrique Perez Filik[3], Diego Esquerdo[4], Nicole Christina Garofalo Fidalgo[4], Paulo Renato Petersen Behar[5]

RESUMO

Introdução: Os fungos do gênero *Cryptococcus*, principalmente as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, são patógenos que causam a meningoencefalite, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. O fungo é inalado, sendo as excretas de aves o nicho mais evidente do *C. neoformans* e as árvores do *C. gattii*. O presente estudo visa pesquisar o fungo *Cryptococcus* spp. nos arredores de grandes hospitais de Porto Alegre e verificar a susceptibilidade destes isolados ambientais aos antifúngicos. **Métodos:** Foram coletadas 87 amostras de excretas de pombos no entorno de seis hospitais de Porto Alegre e semeadas. As colônias leveduriformes foram analisadas macro e microscopicamente e submetidas a provas bioquímicas e moleculares. Posteriormente, estes isolados foram submetidos aos testes de susceptibilidade aos antifúngicos Etest® (Biomérieux) e MIC Strip Test® (Leofilchem). **Resultados:** Os fungos do gênero *Cryptococcus* foram isolados em seis amostras, sendo que cinco foram identificados, pelas provas convencionais, como o *C. neoformans* e uma o *C. gattii,* porém estas espécies não foram confirmadas pelas provas moleculares. No antifungigrama se encontraram entre os isolados de *C. neoformans* faixas de valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 0,25-8 μg/ml para anfotericina B, 0,125->32 μg/ml para cetoconazol, 0,75->256 μg/ml para fluconazol, 0,125->32 μg/ml para voriconazol, e todas apresentaram CIM >32 μg/ml para itraconazol. **Conclusões:** A presença deste fungo em áreas hospitalares pode configurar um risco biológico, já que nestas áreas circulam muitos indivíduos imunocomprometidos, e a presença de cepas resistentes aos antifúngicos pode levar a uma diferente forma de conduzir o tratamento das patologias provocadas por esta levedura.

UNITERMOS: *Cryptococcus* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, Criptococose, Antifúngicos.

ABSTRACT

Introduction: *Fungi of the Cryptococcus genus, mainly the species C. neoformans and C. gattii, are pathogens that cause meningoencephalitis, especially in immunocompromised individuals. The fungus is inhaled, with the excreta of birds being the most obvious niche of C. neoformans and trees of C. gattii. This study aims to find the Cryptococcus* spp. *fungus on the outskirts of large hospitals in Porto Alegre and check the susceptibility of these environmental isolates to antifungal agents.* ***Methods:*** *We collected 87 samples of pigeon feces in the surroundings of six hospitals in Porto Alegre and cultured them. The yeast colonies were analyzed macroscopically and microscopically and subjected to biochemical and molecular tests. Subsequently these isolates were submitted to susceptibility tests to antifungals Etest® (Biomerieux) and MIC Strip Test® (Leofilchem).* ***Results:*** *Fungi of the Cryptococcus genus were isolated in 6 samples, of which 5 were identified by conventional tests, such as C. neoformans and C. gattii, but these species were not confirmed by molecular tests. On antifungal susceptibility tests in C. neoformans isolates showed minimum inhibitory concentration values (MIC) ranging from 0.25 to 8 g/ml for amphotericin B, 0.125-> 32 ug/ml for ketoconazole, 0,75-> 256/ml for fluconazole, and 0.125->32 ug/ml for voriconazole, and all showed MIC>32 mg/ml for itraconazole.* ***Conclusion:*** *The presence of this fungus in hospital areas may pose a biohazard, as many immunocompromised individuals circulate in these areas, and the presence of antifungal resistant strains can lead to a different way of conducting the treatment of disorders caused by this yeast.*

KEYWORDS: *Cryptococcus* spp.*, Cryptococcus neoformans, Cryptococcus gattii, Cryptococcosis, Antifungal.*

[1] Professora Associada na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Professora orientadora do Projeto de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).
[2] Professora assistente na UFCSPA.
[3] Acadêmico do curso de Medicina da UFCSPA.
[4] Acadêmico do curso de Medicina da UFCSPA. Bolsista do projeto "Jovens talentos para a Ciência" do CNPq.
[5] Professor adjunto de Infectologia da UFCSPA e médico-chefe do Serviço de Infectologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

INTRODUÇÃO

O fungo *Cryptococcus* contém duas espécies reconhecidas por seu potencial patogênico, o *C. neoformans* e o *C. gattii* (1). Já existem relatos de infecções também por outras espécies, como o *C. laurentti* e *C. albidus*(2).

Ambos os patógenos podem afetar hospedeiros imunocompetentes e imunocomprometidos, provocando infecções pulmonares no sistema nervoso central e disseminadas para outros órgãos ou sistemas (3). Atualmente, já está bem estabelecida a relação entre as infecções pelo *C. neoformans* e pacientes (4,5,6).

A presença do *C. gattii* está relacionada principalmente aos eucaliptos, madeira em decomposição e ocos de árvores tropicais, como cássia, oiti, fícus, mulungu, e guttarda (7). No nordeste e norte do Brasil, essa micose é endêmica (8). Com o aumento da incidência do *C. gattii* em regiões de climas temperados, tem mudado o conceito de que se restringia apenas a climas tropicais (9,10).

O *C. neoformans* é cosmopolita comumente encontrado na natureza, em excretas de aves (11). Essas excretas são um substrato para a levedura, pela presença de ureia e creatinina como fontes de nitrogênio e pH alcalino necessário para o desenvolvimento do fungo (12). Estudos mostram a presença do *C. neoformans* em aves como psitacídeos e passeriformes (13,14,15), mas o principal reservatório deste fungo são as excretas dos pombos pela sua adaptação ao ambiente (15), expondo, assim, a população a esse patógeno.

O contágio ocorre pela inalação dos elementos fúngicos presentes no ambiente e pela deposição alveolar (7). O desenvolvimento da criptococose em indivíduos após exposição ambiental de fonte infectante requer cuidados pelos indivíduos.

A presença de reservatórios nos arredores dos hospitais pode configurar um importante problema de saúde pública, visto que nestas áreas existem indivíduos imunocomprometidos, portanto, um grupo de risco para adquirirem a criptococose.

Este estudo tem como objetivo isolar e identificar o fungo *Cryptococcus* spp. em excretas de aves nos arredores de grandes hospitais de Porto Alegre e avaliar a susceptibilidade dos isolados aos antifúngicos comumente usados no tratamento da criptococose.

O projeto original foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFCSPA sob o número 10-729.

MÉTODOS

Foram coletadas excretas de pombos nas regiões que circundam as áreas externas de hospitais em Porto Alegre. Foram a Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), o Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), o Hospital de Pronto Socorro (HPS), o Hospital Moinhos de Vento (HMV), o Hospital São Lucas da PUCRS (HSLP) e o Grupo Hospitalar Conceição (GHC). A escolha deses hospitais foi determinada por serem locais de intensa circulação de pessoas, tanto imunocompetentes como imunocomprometidos, e por conter grande quantidade e constante presença de pombos.

O recolhimento das amostras foi feito semanalmente, durante o período de janeiro a dezembro de 2013, totalizando 87 amostras. Todas as coletas foram realizadas em locais abertos, em volta dos hospitais nas calçadas ou ruas, com grande fluxo de pessoas. Para o recolhimento das amostras, foi utilizada uma espátula de madeira estéril, e as excretas recolhidas foram depositadas em um frasco estéril. Com o intuito de diferenciar as excretas de pombos das de outras aves, as coletas foram feitas em locais onde foi observada a presença constante dos pombos. É importante ressaltar que nenhum experimento foi realizado com tais animais durante o estudo, foram utilizadas somente excretas presentes nos locais de coleta, em respeito aos princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (16) e de acordo com os critérios estabelecidos no *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (17).

As amostras foram recolhidas e processadas no laboratório de Parasitologia e Micologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) O processamento das amostras seguiu o protocolo descrito por Passoni *et al.* (1998)(18), através da cultura em agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e agar níger, incubadas em estufa na temperatura entre 25 e 30°C, durante 5 a 7 dias. No crescimento do fungo, as colônias mucoides, brilhantes e viscosas, de cor branca/creme no agar Sabouraud e de cor marrom no agar níger, indicam presuntivamente a presença do *Cryptococcus* spp.. Nesses casos, as colônias foram submetidas às provas confirmatórias, da urease e da canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). O *Cryptocopccus* spp. é urease positiva. O *C. gattii* é resistente à L-canavanina, e cresce no meio de CGB. O *C. neoformans,* sensível à L-canavanina, não cresce neste meio de cultura (19).

Para confirmação molecular, os isolados de *Cryptococcus* na cultura foram submetidos à extração de DNA utilizando o kit de extração MycXtra (Myconostica, UK). A partir do DNA extraído, foram feitos a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o sequenciamento de primers.

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

Para a realização do antifungigrama, foram utilizados o Etest® (Biomérieux) de voriconazol, fluconazol e anfotericina B e o MIC Strip Test®(Leofilchem) para o itraconazol e cetoconazol. Foi utilizado o meio agar RPMI 1640, acrescido de MOPS e 2% de glicose em placas de 4±0,5mm. O inócuo foi obtido através da preparação de uma solução salina estéril (0,85 NaCl) até atingir a turbidez 01 na escala de McFarland. A leitura dos resultados foi realizada após 48 horas de incubação em estufa a 35°C seguindo as recomendações dos fabricantes (19).

RESULTADOS

Das 87 amostras coletadas, 17 (19,54%) provêm dos arredores do HCPA; 18 (20,68%) da área do HPS; 12 (13,80%) em volta do HSL; 12 (13,80%) circunvizinho ao HMV, 15 (17,24%) nas proximidades do GHC e 13 (14,94%) nas imediações da ISCMPA, apresentado na Tabela 1. Após os testes confirmatórios, 6 (6,9%) amostras apresentaram resultados positivos para o *Cryptococcus* spp.. Das amostras positivas, duas (33,3%) provêm do HPS, duas (33,3%) do HSL, uma amostra (16,67%) do GHC (setembro de 2013), uma (16,67%) do HMV.

Das seis amostras positivas submetidas às provas para identificação das espécies, uma reagiu positivamente, indicando a presença do *Cryptococcus gattii*, e as outras cinco não reagiram, sugerindo a presença do *Cryptococcus neoformans*.

Na confirmação molecular, as amostras amplificaram com pelo menos um conjunto de primers. As seis amostras que amplificaram e que foram submetidas ao sequenciamento confirmaram homologia para *Cryptococcus* spp. no programa Blast®, uma das sequências (44 pares de bases) apresentou 92% de identidade para *Cryptococcus neorformans* var. *grubii* (número de acesso: CP003831.1); outro isolado (381 pares de bases) apresentou 96% de identidade para *Cryptococcus albidus* (isolado KDLYL12-1; número de acesso: JX174413.1) e uma terceira amostra (569 pares de bases) apresentou 99% de identidade para *Cryptococcus albidus* (isolado KDLYL12-1; número de acesso: JX174413.1). As outras três amostras, ao realizar o Blast®, apresentaram homologia com *Cryptococcus* spp.. O *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* foi encontrado na amostra coletada no HSL, um isolado de *Cryptococcus albidus* foi encontrado no HPS e o outro no GHC.

A Tabela 2 resume a susceptibilidade *in vitro* dos cinco isolados ambientais de *C. neoformans*. A anfotericina B apresentou uma ampla faixa de valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), variando de 0,25µg/ml até 8 µg/ml, sendo que duas das amostras, a 8 e a 65, apresentaram resistência a este antifúngico. As faixas de valores de CIM para o fluconazol foram de 0,75µg/ml até >256 µg/ml; para o voriconazol a faixa de valores foi de 0,125 µg/ml até >32µg/ml; para o cetoconazol, os valores variaram entre 0,125 µg/ml até >32 µg/ml. Todas as amostras testadas apresentaram CIM >32 µg/ml para o itraconazol. As amostras 51 e 56 foram resistentes a todos os antifúngicos azólicos testados.

DISCUSSÃO

Em alguns locais, a limpeza frequente diminuiu o acúmulo de excretas, apesar da presença dos pombos em grande quantidade, devido aos espaços e à alimentação disponível fornecida pelos indivíduos. Outro aspecto relevante é a presença de área arborizada em torno dos hospitais com temperatura amena e sem incidência de luz solar direta, condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do fungo, e todas as amostras coletadas consistiram em excretas secas de aves (19). As coletas foram realizadas em ambientes abertos sem acúmulo de excretas e com fluxo intenso de pessoas, aproximando a real exposição destes indivíduos ao patógeno em questão (19,20). Esta constatação foi demonstrada por Faria *et al.* (20), com positividade

Tabela 1 – Amostras coletadas por hospital.

Hospitais	Nº de Coletas	Porcentagem de Coletas Realizadas (%)	Nº de Amostras Positivas	Porcentagem de Amostras Positivas (%)	
				Das coletas realizadas no hospital	Do total de coletas
HCPA	17	19,54	0	0	0
HPS	18	20,68	2	11,11	2,3
HSL	12	13,8	2	16,66	2,3
HMV	12	13,8	1	8,33	1,14
GHC	15	17,24	1	6,66	1,15
ISCMPA	13	14,94	0	0	0
Total	**87**	**100**	**6**	**6,9**	

Tabela 2 – Susceptibilidade aos antifúngicos.

Amostra	Anfotericina B	Itraconazol	Cetoconazol	Fluconazol	Voriconazol
8	2 µg/ml	>32µg/ml	4 µg/ml	24 µg/ml	0,25 µg/ml
12	0,25 µg/ml	>32µg/ml	0,75 µg/ml	6 µg/ml	0,125 µg/ml
51	0,25 µg/ml	>32µg/ml	>32µg/ml	>256µg/ml	>32µg/ml
56	0,64 µg/ml	>32µg/ml	>32µg/ml	>256µg/ml	>32µg/ml
65	8 µg/ml	>32µg/ml	4 µg/ml	24 µg/ml	0,25 µg/ml

de 28,6% em engenhos e armazéns de arroz com acúmulo de excretas de aves e 11,1% em ambientes abertos. A positividade neste estudo equivale a outros estudos brasileiros que obtiveram entre 4,3% e 31,3% de amostras positivas para o *C. neoformans* (21,22,23,24).

A amostra positiva para o *C. gattii* foi coletada nos arredores do HSL. Este hospital possui uma extensa área verde em seu entorno e a presença do *Eucalyptus* spp., um nicho deste fungo. A presença do *C. gattii* nas excretas de aves corrobora com os dados da literatura de que esta levedura pode também compartilhar outros nichos ecológicos (25). No entanto, a não confirmação desta espécie pela pesquisa molecular reforça a necessidade de mais estudos, pois a presença do fungo *Cryptococcus* é um fato confirmado nos ambientes em torno dos hospitais incluídos no presente estudo.

A confirmação molecular dos achados positivos no presente estudo é semelhante ao estudo de Silva *et al.* 2010(26), no qual foram avaliadas a virulência e a caracterização molecular de 62 excretas de pombos e 11 amostras de árvores. O *C. neoformans* foi isolado em 43,8% das amostras totais.

A técnica molecular por PCR tem sido considerada a de maior especificidade para identificação e diferenciação do *Cryptococcus* spp. (7,26), em comparação a outras técnicas bioquímicas convencionais, porém seu custo, tempo de realização e tecnologia necessária fazem com que outras provas, como a urease e o CGB, sejam mais utilizadas na prática clínica (7). Sendo assim, ainda são poucos os estudos moleculares para identificação de amostras fúngicas isoladas do ambiente e da clínica (19,26).

Uma das limitações encontradas neste estudo foi a dificuldade de garantia da origem das excretas analisadas, apesar da grande quantidade de pombos presentes nos locais de coleta. Entretanto, a presença do *C. neoformans* em excretas de aves é relatada por Marietto *et al.* (2011) (15), não havendo especificidade do fungo por uma única espécie de ave.

As dificuldades terapêuticas têm sido uma preocupação no tratamento da criptococose e também de outras micoses. Neste estudo, a variação das concentrações inibitórias mínimas para a anfotericina B foi muito ampla (0,25 μg/ml - 8 μg/ml), contrastando com dados da literatura que apresentam faixas estreitas de CIM para este antifúngico (27,28,29). Duas das cinco amostras testadas apresentaram resistência a este agente, fato já relatado em estudos anteriores (30).

Todos os isolados neste estudo foram resistentes ao itraconazol, contrapondo a afirmação de boa resposta *in vitro* a este antifúngico (27,28,29,30). Favalessa *et al.* (28) encontraram 8% de resistência e 16% de susceptibilidade nos isolados de *C. neoformans* em amostras clínicas de pacientes HIV positivos.

Neste estudo, o antifúngico fluconazol apresentou 40% de resistência e 20% de susceptibilidade, o que difere de outros estudos com isolados ambientais de *C. neoformans*, que apresentaram susceptibilidade a este antifúngico e aumento da resistência nos isolados de amostra clínica (28,29,30), alertando ao fato de cepas que possam naturalmente serem resistentes ao fluconazol.

O cetoconazol não é indicado para o tratamento da criptococose, no entanto, foi incluído neste estudo para verificar a suscetibilidade, fato confirmado nas duas amostras isoladas neste estudo.

CONCLUSÃO

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

Sendo o ambiente a fonte deste patógeno, é importante averiguar a susceptibilidade aos agentes antifúngicos, uma vez que, possivelmente, estas cepas possam vir a infectar pacientes no futuro, como consequência o tratamento empírico também deverá ser reavaliado.

REFERÊNCIAS

1. Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Nov;56(11):5898-906.
2. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-neoformans *Cryptococcal* Infections: a Systematic Review. Infection, 2007;35(2):51
3. La Hoz RM, Pappas PG. Cryptococcal Infections: Changing Epidemiology and Implications for Therapy. Drugs, 2013 May;73(6):495-504.
4. Jongwutiwes U, Sungkanuparph S, Kiertiburanakul S. Comparison of clinical features and survival between cryptococcosis in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. Jpn J Infect Dis. 2008 Mar;61(2):111-5.
5. Kiertiburanakul S, Wirojtananugoon S, Pracharktam R, Sungkanuparph S. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients. Int J Infect Dis. 2006 Jan;10(1):72-8.
6. Yuchong C, Fubin C, Jianghan C, Fenglian W, Nan X, Minghui Y, Yalin S, Zhizhong Z. Cryptococcosis in China (1985-2010): review of cases from Chinese database. Mycopathologia. 2012 Jun;173(5-6):329-35.
7. Sidrim, JJC, Rocha, MFG. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Rio de Janeiro, R.J.: Editora Guanabara Koogan LTDA, 2010.
8. Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RC, *et al.* Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Brazil: Analysis of Host and Regional Patterns. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(1):73.
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of *Cryptococcus gatti* - Pacific Northwest, 2004-2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2010;59(28):865-868
10. Hagen F, Colom MF , Swinne D, Tintelnot K, Iatta R, Montagna MT, *et al.* Autochthonous and Dormant *Cryptococcus gattii* Infections in Europe. Emerg Infact Dis. 2012; 18(10):1618-1624
11. Gullo FP, Rossi SA, Sardi Jde C, Teodoro VL, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013 Nov;32(11):1377-91.

12. Rosario I, Acosta B, Colim MF. *Pigeons and other birds as a reservoir for Cryptococcus spp.* Rev Iberoam Micol. 2008;25(1):13-18.
13. Hedayati MT, Mayahi S, Fakhar M, Shokohi T, Majidi M. *Cryptococcus neoformans* isolation from swallow (Hirundo rustica) excreta in Iran. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2011 May-Jun;53(3):125-7.
14. Lugarini C, Goebel CS, Condas LA, Muro MD, de Farias MR, Ferreira FM, *et al. Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. Mycopathologia. 2008 Aug;166(2):61-9.
15. Marietto GGA, Grandi F. Are all psittacine birds carriers of *Cryptococcus neoformans?*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2011;106(6):781-782 .
16. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL/COBEA. Princípios Éticos. São Paulo. Disponível em: http://www.cobea.org.br/conteudo/view
17. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C. 1996. Disponível em: http://www.nap.edu/openbook.php
18. Passoni LF, Wanke B, Nishikawa MM, Lazéra MS. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. Med Mycol. 1998 Oct;36(5):305-11.
19. Teodoro VL, Gullo FP, Sardi JC, Torres EM, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. Rev Soc Bras Med Trop. 2013 Nov-Dec;46(6):759-64.
20. Faria RO, Nascente PS, Meinerz AR, Cleff MB, Antunes TA, Silveira ES, et al. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon excrement in the city of Pelotas, State of Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2010 Mar-Apr;43(2):198-200.
21. Baroni FA, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera IN, Oliveira MT, et al. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006 Mar-Apr;48(2):71-5.
22. Mezzari A, Ayub MN, Griebeler IH, Comachio M, Fogaça RFH, Aquino VR, *et al.* Isolamento de *Cryptococcus* spp. em excretas de pombos na cidade de Porto Alegre e prevalência das espécies isoladas no serviço de micologia do serviço de micologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS. News Lab. 2013 Out/Nov;120:116-22.
23. Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. Med Mycol. 2000 Oct;38(5):385-90.
24. Silva JO, Capuano DM. Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, no excreta de pombos na cidade de Ribeirão Preto, SP, Brasil. Rev Inst Adolfo Lutz. 2008;67:137-41
25. Jesus MS, Rodrigues WC, Barbosa G, Trilles L, Wanke B, Lazéra Mdos S, Silva Md. *Cryptococcus neoformans* carried by Odontomachus bauri ants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012 Jun;107(4):466-9.
26. Silva AL, Paim FK, Vergara SML, Pedrosa AL. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. *Fungal Biol.* 2010; 114:438-45.
27. Alves SHI, Oliveira LT, Costa JM, Lubeck I, Casali AK, Vainstein MH. In vitro susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococus neoformans* isolated in Southern of Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2001 Sep-Oct;43(5):267-70.
28. Favalessa OC, Ribeiro LC, Tadano T, Fontes CJ, Dias FB, Coelho BP, Hahn RC. First description of phenotypic profile and in vitro drug susceptibility of *Cryptococcus* spp. yeast isolated from HIV-positive and HIV-negative patients in State of Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop. 2009 Nov-Dec;42(6):661-5.
29. Tangwattanachuleeporn MI, Somparn P, Poolpol K, Gross U, Weig M, Bader O. Prevalence and antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolated from pigeon excreta in Chon Buri Province, Eastern Thailand. Med Mycol J. 2013;54(3):303-7.
30. Trpković A, Pekmezović M, Barać A, Crnčević Radović L, Arsić Arsenijević V. In vitro antifungal activities of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole and itraconazole against *Cryptococcus neoformans* isolated from cerebrospinal fluid and blood from patients in Serbia. J Mycol Med. 2012 Sep;22(3):243-8.

✉ Endereço para correspondência
Adelina Mezzari
Av. Ipiranga, 2752
90.610-000 – Porto Alegre, RS – Brasil
☎ (51) 3308-2105
💻 mezzari@ufrgs.br

Recebido: 18/5/2015 – Aprovado: 26/5/2015