

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

BEATRIZ CELLA DAL MOLIN

**INVESTIGAÇÃO DE *Cryptococcus* spp. E OUTRAS LEVEDURAS EM EXCRETAS
DE AVES PRESENTES EM PRAÇAS PÚBLICAS DE CAMPO GRANDE, MS**

CAMPO GRANDE

2023

BEATRIZ CELLA DAL MOLIN

**INVESTIGAÇÃO DE *Cryptococcus* spp. E OUTRAS LEVEDURAS EM EXCRETAS
DE AVES PRESENTES EM PRAÇAS PÚBLICAS DE CAMPO GRANDE, MS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito para
obtenção de graduação no curso de
Farmácia da Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marilene
Rodrigues Chang

CAMPO GRANDE

2023

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao Universo e a energia divina pela oportunidade de experienciar a vida terrena com uma família e amigos que me apoiam e estão ao meu lado para vivenciar todos os momentos.

Agradeço a mim por não desistir e minha mãe Silvia Cella por me amar e aconselhar e guiar por qualquer caminho escolhido. Agradeço ao meu pai Elcio Dal Molin por mostrar que a vida pode ser mais leve e também à minha irmã Izabella pelo apoio e ideias futuras. Agradeço aos demais familiares, avós, tias e principalmente meu padrasto Renato Candido, pela filosofia diária e incentivo à novos conhecimentos.

Agradeço ao sapafarma, principalmente, a Beatriz Dias e o Lafaiete Zago por me ajudarem a estudar e festar sempre que necessário, serem melhores amigos e enfrentarem as dificuldades juntos por todos esses anos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2.1.	Características do gênero <i>Cryptococcus</i>	9
2.2.	Criptococose.....	11
2.3.	<i>Cryptococcus</i> spp. no ambiente.....	12
2.4.	Isolamento e procedimento para identificação de leveduras de interesse médico do ambiente.....	12
3	OBJETIVOS.....	14
3.1.	Objetivo geral.....	14
3.2.	Objetivos específicos.....	14
4	METODOLOGIA.....	14
4.1.	Delineamento da pesquisa.....	14
4.2.	Locais de pesquisa.....	15
4.3.	Coleta de amostra.....	15
4.4.	Preparo do material.....	15
4.5.	Processamento da amostra.....	15
4.6.	Identificação das leveduras.....	16
4.6.1.	Testes fenotípicos clássicos.....	16
4.6.2.	Testes em sistemas automatizados.....	18
5	RESULTADOS.....	18
6	DISCUSSÃO.....	20
7	CONCLUSÃO.....	23
	REFERÊNCIAS.....	24
	APÊNDICE A – PREPARO DE MATERIAL.....	31

RESUMO

O solo é um habitat rico em microrganismos. O ambiente que possui uma elevada carga microbiana de fungos com potencial patogênico como leveduras dos complexos *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* podem favorecer a inalação de propágulos infectantes e desenvolvimento de doenças. Esses fungos estão presentes em excrementos de pombos (*Columba livia*) e troncos de árvore em decomposição. Considerando a existência de casos de criptococose em Campo Grande, MS e poucos estudos de isolamento dessas leveduras em amostras ambientais, foi objetivo desta pesquisa, investigar a presença de *Cryptococcus* spp. e outras leveduras de interesse médico em praças públicas com alta movimentação de pessoas em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. No período de julho a outubro de 2023. 50 amostras de excrementos secos de pombos foram isoladas de 3 praças públicas: Praça A, B e C. AS amostras foram semeadas em ágar Níger, e posteriormente as colônias características de leveduras foram repicadas em ágar sabouraud dextrose com cloranfenicol para conservação. Em 25 (50%) amostras de excrementos de pombos, foram selecionadas 29 colônias de leveduras. Dessas, fez-se exame micológico direto para observação dos aspectos microscópicos e identificação por meios de técnicas fenotípicas (ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol-CGB, ágar uréia e auxanograma). Nove (31%) colônias de *Cryptococcus* spp., diferenciadas por métodos convencionais, foram identificadas no sistema automatizado VITEK® 2. Na presente pesquisa não foram identificadas as espécies patogênicas dos complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Entretanto, em 25 (50%) amostras foram identificadas outras leveduras como *Rhodotorula* sp. (28%); *Candida* sp. (17%) e *Sporobolomyces* spp. (7%). Das 14 colônias identificadas como *Cryptococcus* spp., 7 (50%) eram *Cryptococcus albidus* e 5 (35%) *Cryptococcus laurentii*. A identificação de leveduras de importância médica em áreas urbanas movimentadas, como praças públicas, indica uma fonte de contaminação do ambiente. Os resultados deste estudo indicam que excrementos secos de pombos e outras aves abrigam leveduras que podem ser veiculadas pelo ar e causar doenças em animais e indivíduos susceptíveis.

Palavras-chave: *Columba livia*; *Cryptococcus albidus*; *Cryptococcus laurentii*; criptococose; área urbana.

ABSTRACT

Soil is a rich habitat for microorganisms. The environment that has a high microbial load of fungi with pathogenic potential such as yeasts from the *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* complexes can favor the inhalation of infectious propagules and the development of diseases. These fungi are present in pigeon droppings (*Columba livia*) and decomposing tree trunks. Considering the existence of cases of cryptococcosis in Campo Grande, MS and few studies on the isolation of these yeasts in environmental samples, the objective of this research was to investigate the presence of *Cryptococcus* spp. and other yeasts of medical interest in public squares with high movement of people in Campo Grande, Mato Grosso do Sul. From July to October 2023. 50 samples of dry pigeon excrement were isolated from 3 public squares: Square A, B and C. The samples were seeded on Niger agar, and later the characteristic yeast colonies were picked on Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol for conservation. In 25 (50%) pigeon excrement samples, 29 yeast colonies were selected. Of these, a direct mycological examination was carried out to observe microscopic aspects and identification using phenotypic techniques (canavanine-glycine-bromothymol blue-CGB agar, urea agar and auxanogram). Nine (31%) colonies of *Cryptococcus* spp., differentiated by conventional methods, were identified in the VITEK®2 automated system. In the present research, the pathogenic species of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* complexes were not identified. However, in 25 (50%) samples other yeasts were identified, such as *Rhodotorula* sp. (28%); *Candida* sp. (17%) and *Sporobolomyces* spp. (7%). Of the 14 colonies identified as *Cryptococcus* spp., 7 (50%) were *Cryptococcus albidus* and 5 (35%) *Cryptococcus laurentii*. The identification of medically important yeasts in busy urban areas, such as public squares, indicates a source of environmental contamination. The results of this study indicate that dried droppings from pigeons and other birds harbor yeast that can be airborne and cause disease in susceptible animals and individuals.

Keywords: *Columba livia*; *Cryptococcus albidus*; *Cryptococcus laurentii*; cryptococcosis; urban area.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Placa de ágar Níger mostrando colônias de leveduras e de fungos filamentosos isolados de excrementos de pombos..... 16
- Figura 2** - Fotografia de exame a fresco com tinta nanquim (400X) com destaque para células leveduriformes com cápsulas característica de *Cryptococcus* sp..... 16
- Figura 3** - Fotografia ilustrando o crescimento de levedura (*Cryptococcus neoformans*) em ASD, ágar Níger, CGB e ágar uréia, respectivamente..... 17
- Figura 4** - Fotografia ilustrando o teste de Auxanograma..... 17
- Figura 5** - Fotografias ilustrativas de três praças públicas e o número de amostras (excrementos de aves) coletadas em cada uma. Campo Grande, MS de junho a outubro de 2023..... 18
- Figura 6** - Leveduras isoladas em excrementos de aves de três praças públicas de Campo Grande, MS de junho a outubro de 2023..... 19
- Figura 7** - Cor e aspecto das colônias e características micro morfológicas das leveduras identificadas..... 20

1. INTRODUÇÃO

O solo é um habitat rico em microrganismos como bactérias, fungos, protozoários, entre outros seres microscópicos. A maioria é considerada sapróbia e possui uma relação equilibrada com o ambiente e outros seres vivos. O ambiente que possui uma elevada carga microbiana de fungos com potencial patogênico como as espécies oportunistas dos complexos *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* podem favorecer a inalação de propágulos infectantes, com desenvolvimento de doença e também causar surtos de infecção em humanos e animais (Kidd *et al.*, 2004). *Cryptococcus* é uma levedura cosmopolita isolada de diversos locais como solo, plantas e excretas de aves (Alves *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2019).

A criptococose é considerada uma das infecções fúngicas sistêmica de maior prevalência mundial e associada a elevada letalidade (de 41% a 61%) principalmente em pacientes que utilizam fármacos imunossupressores e pacientes HIV positivo (Alastruey-Izquierdo, 2022; Zaragoza, 2019). A presença de grande quantidade de *Cryptococcus* spp. e outras leveduras em ambiente com grande circulação de pessoas, como parques, praças públicas, igrejas e escolas, pode ser fonte de infecção para humanos, animais e também causar surtos (Kidd *et al.*, 2004; Malik *et al.*, 2003).

Espécies pertencentes aos complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são basidiomicetos encapsulados com maior importância clínica. A infecção se dá por inalação dos propágulos fúngicos. Do pulmão se disseminam via corrente sanguínea para outros órgãos, com especial tropismo para o sistema nervoso central (SNC). De acordo com Alastruey-Izquierdo (2022), *C. neoformans* é responsável por 99% dos casos de criptococose, sendo listado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos quatro fungos patogênicos mais críticos. As principais apresentações clínicas da criptococose são pneumonia e neurocriptococose. Infecções no trato urinário e de corrente sanguínea também são descritas, assim como, criptococose cutânea primária que é menos frequente.

A cidade de Campo Grande com cerca de 916.001 habitantes (IBGE, 2021), é uma cidade bastante arborizada e com grande variedade de aves. Estudos prévios mostram que locais onde há acúmulo de excretas de aves como praça pública, escolas e unidades de saúde podem ser fontes de infecção devido a uma maior

concentração de propágulos fúngicos infectantes presentes nestes ambientes (Baroni, *et al.* 2006; Beck *et al.* 2003; Corrêa Junior, 2019; Silva, 2022). Considerando os casos de criptococose registrados em Mato Grosso do Sul e que o principal habitat dessas leveduras é o solo contaminado com fezes de aves, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de *Cryptococcus* spp. em praças públicas de Campo Grande, MS e contribuir com a descrição de fontes ambientais de leveduras com potencial patogênico na Região Centro-Oeste do Brasil.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Características do gênero *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus* possui mais de 70 espécies, sendo as espécies do complexo *C. neoformans* e *C. gattii* as com potencial para causar criptococose (Kwon-Chung *et al.*, 2011; Takahara *et al.*, 2013). São leveduras que medem de 5 µm a 20 µm de diâmetro. Possuem reprodução assexuada por brotamento único ou múltiplo (Kwon-Chung *et al.*, 1982). Esses fungos são encontrados em excrementos secos de pombos (*Columba livia*) e em ocos de árvores envelhecidas, principalmente em decomposição, devido a capacidade dos *Cryptococcus* spp. de produzir lacase (Baltazar; Ribeiro, 2008; Takahara *et al.*, 2013).

Em torno de 1949 foi descoberto quatro sorotipos de *C. neoformans*, até então conhecida como espécie homogênea, baseado nas características da cápsula (Meyer *et al.*, 2009). O complexo de espécies de *C. neoformans* atualmente inclui as espécies *C. neoformans* variedade *grubii*, com subdivisão genética VNI, VNII, VNIII (genotipos VNIIIa/VNIIIb) e *C. neoformans* variedade *neoformans* dado nome de *C. deneoformans* (VNIV). O tipo molecular VNIII é considerado um híbrido de *C. neoformans* VNI com *C. deneoformans* VNIV.

Cryptococcus neoformans é o agente oportunista predominante em pacientes imunocomprometidos, como pacientes em uso contínuo de corticóides, leucêmicos e principalmente portadores do vírus HIV (Chang *et al.*, 2008; Takahara *et al.*, 2013; Tsujisaki *et al.*, 2013).

O complexo de *Cryptococcus gattii* é composto pelas espécies *C. gattii* (VGI), *C. deuterogattii* (VGII com subtipos VGIIa, VGIIb, VGIIc), *C. bacillisporus* (VGIII), *C.*

tetragattii (VGIV) e um híbrido *C. decagattii* (VGIIIc/VGIV) (Byernes III *et al.*, 2011; Farrer, 2019; Hagen *et al.*, 2015; Kwon-Chung *et al.*, 2017). Esse complexo de *C. gattii* continua expandindo com novas descobertas, como o novo tipo VGV, ainda sem nomenclatura (Montoya *et al.*, 2021; Wirth *et al.* 2018). *Cryptococcus gattii* era considerada estrita de climas tropicais e subtropicais no mundo, porém devido ao polimorfismo, atualmente, está espalhada em climas temperados como Canadá, indicativo de microevolução (Kidd *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2009). A colonização de *C. gattii*, com prevalência no genótipo VGII, já foi identificada em diversas áreas como solo, espécies de árvores, ninho de vespa, insetos, humanos e animais, inclusive aquáticos, do tipo molecular VGI, podendo viver períodos longo em água do mar (Kidd *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2002).

O *Cryptococcus gattii*, apesar de ter baixa incidência, acomete pessoas imunocompetentes (Chang *et al.*, 2008; Heitman *et al.*, 2011). Todos os seus tipos moleculares (VGI a VGIV) já foram isolados em pessoas imunocompetentes e imunocomprometidos, sendo as cepas *C. gattii* VGIII e VGIV mais frequentes em pacientes HIV positivo e as cepas VGI e VGII em imunocompetentes com variação de risco de acordo com o tipo molecular (Chen; Meyer; Sorrell, 2014; Litvintseva, 2005).

Segundo Mitchell e Perfect (1995) e Silva (2020), a principal característica de virulência desse complexo *Cryptococcus* spp. é a cápsula mucopolissacarídeo, sendo o único fungo patogênico que a possui. A cápsula é um fator importante para evitar dessecação no ambiente e proteção oxidativa dentro do hospedeiro (Zaragoza *et al.*, 2008). Outra característica é capacidade de produzir enzima urease, melanina e também crescer em temperaturas de 37°C, ou seja, correspondente à temperatura do corpo humano. De acordo com Cox *et al.* (2000) e Olszewski *et al.* (2004), os sintomas se agravam na presença de urease e possibilita a deslocação da cepa pela barreira hematoencefálica, se mantendo por mais tempo no sistema nervoso.

2.2. Criptococose

Segundo Silva *et al.* (2020) são estimados mais de 223 mil casos de criptococose por ano no mundo em indivíduos com HIV/aids, cerca de cinco mil apenas na América Latina, sendo o Brasil um dos países com maior incidência. Essa doença possui alta taxa de letalidade (Faria *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2018; Silva;

Capuano, 2008; Tsujisaki *et al.*, 2013). No estado de Mato Grosso do Sul, Lindenber *et al.* (2008) descreveram que 51% de portadores do HIV e 41% entre a população HIV-negativa com criptococose foram a óbito. A média de internação de pacientes HIV-positivo hospitalizados com criptococose é de 18 a 39 dias (Alastruey-Izquierdo, 2022).

A criptococose é uma micose sistêmica, sendo sua apresentação clínica mais comum na forma de meningite criptocócica ou meningoencefalite devido à afinidade dos *Cryptococcus* spp. pelo sistema nervoso central (Nunes *et al.*, 2018), podendo ser confundida com tuberculose e neoplasia (Santos *et al.*, 2015). De acordo com estudo de Kidd *et al.* (2004), os propágulos desse fungo são pequenos o suficiente para invadir a área pulmonar mais profunda, sendo continuamente exposta a partículas exógenas.

Os sintomas pulmonares da infecção por *Cryptococcus* spp. envolvem tosse com eliminação de sangue, dispneia, dor no peito e raramente nódulos pulmonares. No caso de infecção por VGI, os sintomas geralmente são lesões pulmonares encapsuladas (Chen *et al.* 2012). Para diagnosticar infecção por *C. gattii* que geralmente atinge o pulmão com cryptococoma, é necessário um exame de imagem por ressonância magnética (RM) ou tomografia computadorizada (TC), assim como imagem cerebral para avaliar a evolução da doença (Chen; Meyer; Sorrell, 2014).

Estudos anteriores mostram no estado de Mato Grosso do Sul, um aumento de casos de criptococose na região sul-mato-grossense (Lindenber *et al.*, 2008; Tsujisaki *et al.*, 2013). Nunes *et al.*, (2018), mostra que *Cryptococcus* é um importante agente de meningite fúngica no estado de Mato Grosso do Sul.

No geral, antifúngicos como: fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol, são recomendados para o tratamento de criptococose (Goodwin; Drew, 2008; Saag *et al.*, 2000). Pesquisas mostraram a eficiência da anfotericina B e da flucitosina no tratamento, incluindo casos de infecção no sistema nervoso central (Bellmann; Smuszkiewicz, 2017). A resistência contra anfotericina B (AmB) é rara, mas pode acontecer pela presença de melanina e se o ergosterol plasmático diminuir, local de acoplamento do fármaco (Ellis, 2002; Van Duin; Casadevall; Nosanchuk, 2002).

2.3. *Cryptococcus* spp. no ambiente

Campo Grande é uma cidade bastante arborizada e rica em aves, incluindo araras e pombos (Abegg, 2006; Alves *et al.*, 2016; Corrêa Jr., 2019; Faria *et al.*, 2010). O complexo de *C. neoformans* tem a capacidade de colonizar a mucosa do papo de pombos, mas raramente causa doença devido à elevada temperatura corporal dessas aves (41,5°C - 43,3°C), comportando-se como endosapróbio natural (Filiú *et al.*, 2002; Gomes, 2011). Os excrementos de pombos fornecem ambiente alcalino e compostos nitrogenados que favorecem a sobrevivência e reprodução de *Cryptococcus* spp. (Rosário; Acosta; Colom, 2008). Estudo realizado por Tsujisaki (2019) mostrou que a maior parte dos pacientes com criptococose por *C. neoformans* em Mato Grosso do Sul residiam em áreas urbanas, e as atividades de maior risco mencionadas incluíam atividades agrícolas, contato com fezes de aves e criação de galinhas.

A presença de *Cryptococcus* spp. já foi relatada em outras aves, como morcego, possivelmente pelo hábito delas rasparem troncos e galhos (Filiú *et al.*, 2002; Tencate *et al.*, 2012).

Os tipos moleculares de *Cryptococcus* spp. mais encontrados no ambiente são *C. neoformans* VNI e VNIII, sendo raro a presença de *C. gattii* em excretas de aves (Abegg *et al.*; 2006; Meyer *et al.*, 2003). No ambiente, conforme estudo de Springer, Mohan e Heitman (2017), restos vegetais são importantes para o ciclo sexual de *Cryptococcus* spp. e liberação dos propágulos infecciosos, sendo as plantas reservatórias desses propágulos.

C. gattii foi primeiramente isolado em *Eucalyptus* sp., e também foi encontrado em oco de árvores tropicais no Brasil, como Cássia rosa (*Cássia grandis*), Fícus (*Fícus microcarpa*) e outras plantas, evidenciando habitats naturais diversos (Filiú *et al.*, 2002; Zúñiga, 2015). Há evidências de que a floração potencializa a dispersão aérea dos propágulos desse fungo (Ellis; Pfeiffer, 1990).

2.4. Isolamento e procedimento para identificação de leveduras de interesse médico do ambiente

Diferentes protocolos de coleta têm sido descritos e variam de acordo com o tipo de amostra. Estudos prévios sugerem que a coleta deve ser feita a partir de fezes secas com o intuito de minimizar a contaminação bacteriana (Corrêa, 2019).

Para o isolamento de leveduras, utiliza-se o ágar Sabouraud dextrose acrescido de antibióticos. Para o isolamento de espécies dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*, utiliza-se o ágar níger preparado com sementes de *Guizotia abyssinica*. Essas sementes contêm ácido cafeico, um substrato para formação de melanina que reage com a enzima fenoloxidase produzida pelo *Cryptococcus* spp. Essa melanina é absorvida pela parede celular da levedura formando colônias de coloração bege a marrom escuro (Aryal, 2022).

A identificação de gênero de leveduras, como *Cryptococcus* spp., pode ser, em grande parte, identificada apenas pela característica morfológica. A colônia da amostra deve ser isolada em plaqueamento e confirmar sua pureza por microscopia. A partir do repique em ASD é necessário realizar a prova da urease e se positiva, associar à cor da colônia, pois tanto *Cryptococcus* sp. como *Rhodotorula* sp. dão positivo e são redondas quando visualizado em microscopia.

O teste da urease também pode ser utilizado para diferenciar leveduras. A urease promove a quebra da uréia em dióxido de carbono e amônia, sendo possível neutralizar ambientes ácidos ao seu redor. Esse aumento no pH do meio faz com que o ágar amarelo mude para rosa brilhante.

Se a cor da colônia for laranja avermelhado, é característico de *Rhodotorula* sp. Caso a colônia for branca, bege ou marrom, característico do gênero *Cryptococcus* spp., verificar a presença de cápsula com tinta nanquim (tinta da china), na qual aparece um halo claro ao redor dos blastoconídios em contraste com o fundo preto. Porém, se mesmo assim a cápsula não for visualizada, ainda é possível que seja *Cryptococcus* sp.

Outro teste fenotípico realizado é o teste de assimilação de fontes de carbono (dextrose, maltose, sacarose, lactose, galactose, melobiose, celobiose, inositol, xilose, rafinose, trealose e dulcitol), também conhecido como auxanograma em ágar YNB (*Yeast Nitrogen Base*) (Kwon-Chung; Fell, 1984). O auxanograma de *C. neoformans* e *C. gattii* é positivo para sacarose, maltose, trealose, xifose, inositol, variável para celubiose, rafinose e negativo para lactose (Anvisa, 2013; Larone, 2011).

A diferenciação da espécie entre *C. neoformans* e *C. gattii* é feito por meio do ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Essa diferenciação ocorre pela diferença de metabolismo desses fungos: *C. gattii* utiliza a glicina como fonte de carbono e nitrogênio deixando o meio alcalino e mudando sua coloração para azul

cobalto e *C. neoformans* é sensível a L-cavanina presente no meio, mantendo o meio da mesma cor verde (Kwon-Chung; Polacheck; Bennett, 1982).

A identificação de leveduras em laboratórios com grande demanda de amostras pode ser feita por sistemas automatizados como: VITEK® MS, VITEK® 2 e BD Phoenix™. Sistemas que utilizam a espectrometria de massa com tempo de voo por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) é um dos métodos mais modernos que identificam de forma bastante rápida bactérias e fungos clinicamente relevantes. Em laboratórios especializados, técnicas moleculares com PCR e sequenciamento de DNA têm sido utilizados com elevada performance (Kord *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a presença e identificar *Cryptococcus* spp. e outras leveduras em excrementos de aves presentes em praças públicas na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar *Cryptococcus* spp. de amostras de excrementos de aves coletadas em praças públicas;
- Identificar outras leveduras em excrementos de aves de praças públicas.

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento da pesquisa

Pesquisa descritiva de natureza transversal, utilizando técnica experimental de classificação qualitativa com amostras ambientais de praças públicas.

Critérios de inclusão: praças públicas com presença de pombos e excrementos secos próximo à observação dessas aves. Critérios de exclusão: praças públicas com ausência de pombos ou apenas fezes úmidas.

4.2. Locais de pesquisa

A coleta de dados sobre praças públicas foi realizada a partir de informação de residentes e visita presencial. O critério de seleção das praças foram: presença de pombos e quantidade de excrementos de aves.

A coleta das amostras foi realizada em três praças públicas de Campo Grande, MS no período de junho a outubro de 2023, em horários variados durante clima seco e ensolarado, sendo elas: A (Praça Ary Coelho), B (Praça Primeiro de Maio,) e C (Praça do Peixe).

4.3. Coleta de amostra

Cada amostra de excrementos foi coletada usando um frasco universal estéril de plástico e uma pá de madeira estéril e armazenados em uma caixa de isopor até a chegada ao Laboratório Microbiológico da UFMS. Durante a coleta fez-se uso de EPI's como máscara, luva e jaleco devido ao risco de contaminação por partículas fúngicas suspensas no ar e por contato. Após a coleta, as amostras foram armazenadas sob refrigeração entre 5°C a 8°C até sua utilização. O procedimento foi realizado de acordo com Corrêa Jr. (2019).

4.4. Preparo do material

Todos os preparos de material estão descritos no Apêndice A.

4.5. Processamento da amostra

De cada amostra foi utilizada 1g de excreta diluída em 50 mL de salina estéril (0,85%), acrescida de cloranfenicol (0,4g/L), macerando a amostra em gral com ajuda do pistilo. Em seguida, a mistura foi colocada em erlenmeyer e agitada em vortex por três min. e repousada por 30 min. Com auxílio de micropipeta, aspirou-se 0,1 mL do

sobrenadante e adicionou-se à placa de ágar níger com cloranfenicol (0,05 g/L). Após, semeadura com alça estéril na placa. 1 ml do sobrenadante foi guardado em microtubo estéril na geladeira. As placas foram incubadas em estufa a 35°C e com tempos de leitura média a cada 24h, 48h e 72h. Procedimento feito de acordo com Corrêa Jr., (2019).

4.6. Identificação das leveduras

4.6.1. Testes fenotípicos clássicos

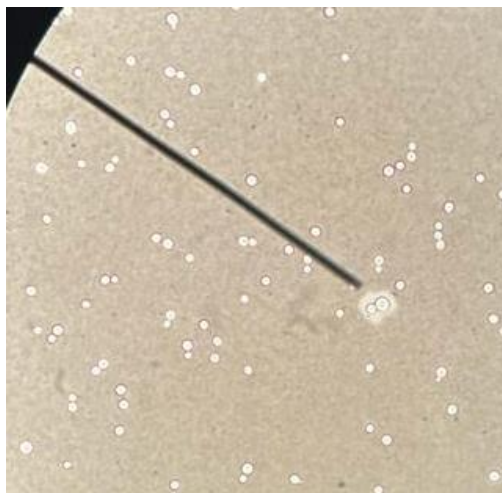
Das colônias com aspectos de leveduras (lisas, cremosas ou mucoides - Figura 1), fez-se exame micológico para observação da micromorfologia e exame a fresco com tinta nanquim para visualizar presença ou não de cápsula (halo transparente - Figura 2).

Figura 1 - Placa de ágar níger mostrando colônias de leveduras e de fungos filamentosos isolados de excrementos de pombos



Fonte: Autora

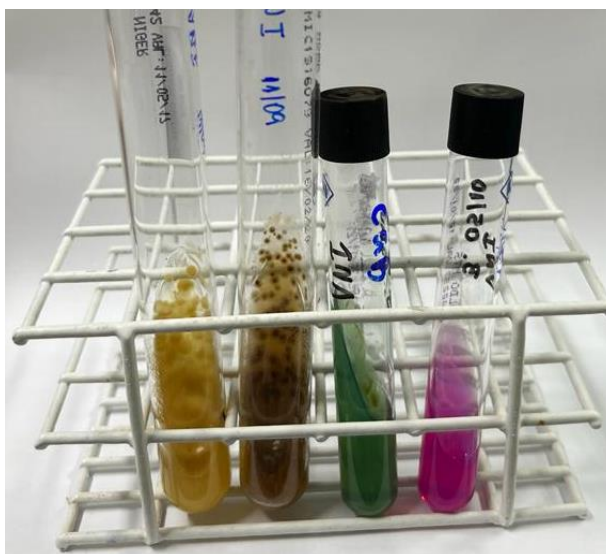
Figura 2 - Fotografia de exame a fresco com tinta nanquim (400X) com destaque para células leveduriformes com cápsulas característica de *Cryptococcus* sp.



Fonte: Autora

As leveduras isoladas em ágar ASD e ágar niger foram identificadas utilizando se o meio de CGB (Canavanina-Glicina-Bromotimol), ágar uréia (Figura 3) e o teste de auxanograma (Figura 4) conforme previamente descrito (Kwon-Chung; Polacheck; Bennett, 1982; Larone, 2011). Todos os testes foram realizados em cabine de segurança biológica.

Figura 3 - Fotografia ilustrando o crescimento de levedura (*Cryptococcus neoformans*) como controle em ASD, ágar níger, CGB e ágar uréia, respectivamente



Fonte: Autora

Figura 4 - Fotografia ilustrando o teste de Auxanograma



Fonte: Autora

Cepas padrões de *Cryptococcus neoformans* VNI e *C. gattii* VGII da micoteca do Laboratório de Pesquisas Microbiológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFMS foram utilizados como controle de qualidade em todos os testes.

4.6.2. Testes em sistemas automatizados

Durante a realização do TCC foi possível realizar visita técnica em três laboratórios de Campo Grande, dos quais dispõem de sistemas automatizados de identificação de bactérias e leveduras: VITEK® 2 (BioMérieux), BD Phoenix™ (Becton Dickinson) e BD™ Bruker MALDI Biotyper® CA System (Becton Dickinson) com utilização do método MALDI-TOF MS. Dez leveduras que não foram possível identificar pelos métodos clássicos, foram identificadas no sistema automatizado VITEK® 2 (BioMérieux).

5. RESULTADOS

De junho a outubro de 2023, 50 amostras de excrementos de pombos foram coletadas em 3 praças públicas selecionadas. A Figura 5 ilustra o número de amostras coletadas em cada praça pública.

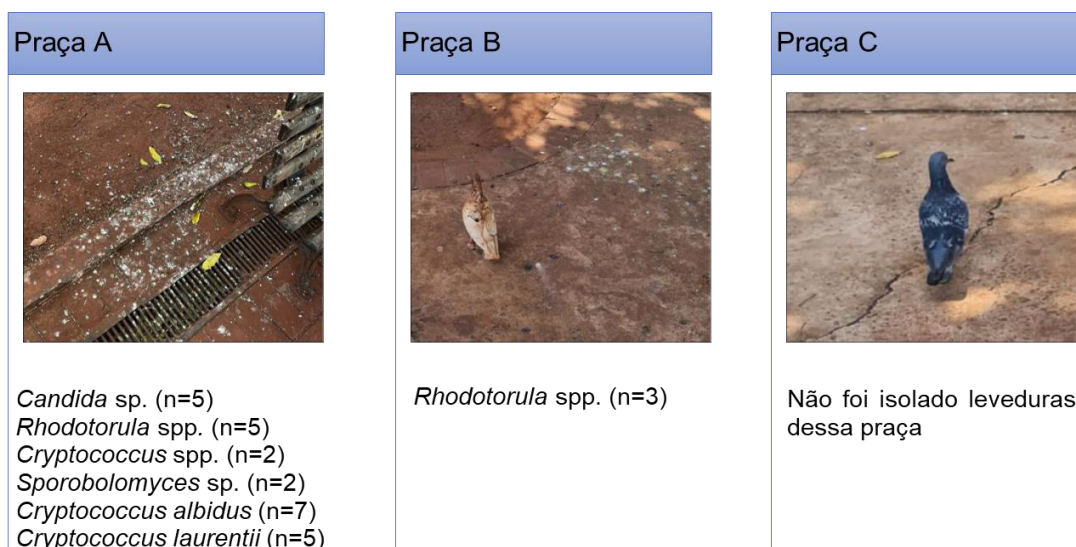
Figura 5 - Fotografias ilustrativas de três praças públicas e o número de amostras (excrementos de aves) coletadas em cada uma. Campo Grande, MS de junho a outubro de 2023



Fonte: Elaborada pela autora

Neste estudo foram isoladas 29 leveduras, sendo 7 (24%) *Cryptococcus albidus*, 5 (17%) *Cryptococcus laurentii* e 2 (7%) *Cryptococcus* spp. As outras leveduras identificadas foram: 8 (28%) *Rhodotorula* sp.; 5 (17%) *Candida* sp. e 2 (7%) *Sporobolomyces* spp. A Figura 6 mostra as leveduras identificadas de acordo com localização e na Figura 7 são mostradas as características macroscópicas e microscópicas das leveduras identificadas.

Figura 6 - Leveduras isoladas em excrementos de aves de três praças públicas de Campo Grande, MS de junho a outubro de 2023



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 7. Cor e aspecto das colônias e características micro morfológicas das leveduras identificadas

Nº da amostra	Cor da colônia	Aspecto da colônia	Micromorfologia (blastocónídios)	Identificação
1 - 5	Branca	Lisa e opaca	Oval	<i>Candida sp.</i>
6 - 13	Laranja	Creмоса	Oval	<i>Rhodotorula sp.</i>
14 - 15	Creme	Mucóide	Redonda	<i>Cryptococcus sp.</i>
28 - 29	Salmão	Creмоса	Redonda a ovais	<i>Sporobolomyces sp.</i>
16 - 22	Creme	Mucóide	Redondo	<i>Cryptococcus albidus</i>
23 - 27	Creme	Mucóide	Redondo	<i>Cryptococcus laurentii</i>

Fonte: Dados obtidos de Larone, (2011). Quadro elaborada pela autora.

6. DISCUSSÃO

Na natureza, a presença de fungos (leveduras e fungos filamentosos), bactérias, protozoários e outros microrganismos é um evento comum (Alves *et al.*, 2016; Medina *et al.*, 2017). Entretanto, sabe-se que esporos de fungos presentes no ambiente podem desencadear sintomas de asma, alergias e também causar doenças (Lam *et al.*, 2023). Como esperado, nas 50 amostras coletadas houve crescimento de fungos e bactérias. O crescimento de fungos filamentosos de crescimento rápido prejudicou o isolamento de algumas leveduras, de modo que somente em 25 (50%) amostras foi possível isolar colônias de leveduras para realizar a identificação das mesmas.

Neste estudo foram identificadas leveduras frequentemente isoladas do ambiente como: *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula spp.* e *Sporobolomyces spp.* (Brito *et al.*, 2019; Jang *et al.* 2011). Espécies dos complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, considerados principais agentes de criptococose não foram isolados das três praças públicas estudadas. Este resultado sugere que apesar de haver excretas de pombos e outras aves nessas praças, a probabilidade de risco de infecção é baixa. A praça A apresentou maior número de amostras coletadas devido a observação de maior número de aves/excrementos em comparação com as praças B e C. A praça A localizada no centro de Campo Grande, tem maior circulação de pessoas e conseqüentemente, maior disponibilidade de alimento para as aves. Faz-se

importante destacar, que durante as visitas para coleta de amostras observou-se medidas de controle de exposição, como limpeza do chão das praças com remoção das excretas de aves.

A identificação de leveduras de importância médica, descrita neste estudo, em áreas urbanas movimentadas, como praças públicas, indica uma fonte de contaminação do ambiente e estimula os gestores municipais a tomar medidas de controle, minimizando assim o número de infecções.

Em Campo Grande, MS, Corrêa Jr. (2019), identificou *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos presentes em quadras desportivas de escolas municipais. A partir deste estudo, gestores municipais criaram a Lei Complementar N° 345 de 18/01/2019 que proíbe a alimentação de pombos urbanos e manutenção de abrigo para ninhos (Lei Complementar N° 345, 2019).

A identificação de leveduras por meio de testes fenotípicos é limitada. Se baseia na observação das características macroscópicas e microscópicas e algumas provas bioquímicas. Os resultados das características macro e microscópicas junto de teste bioquímicos realizados (meio CGB, uréia e auxanograma) não foram suficientes para caracterizar algumas espécies de *Cryptococcus* spp. Contudo, foram suficientes para identificar as leveduras a nível de gênero.

As espécies de *Cryptococcus* como *C. albidus* e *C. laurentii* são consideradas sapróbios que adquirem seus nutrientes a partir de matéria orgânica em decomposição. Raramente causam infecções fúngicas invasivas, mas há evidências de que essas espécies são responsáveis por 80% dos casos de criptococose causada por *Cryptococcus não-neoformans* e *não-C.gattii* (Khawcharoenporn; Apisarnthanarak; Mundy, 2007). Estudo de Jam *et al.* (2011) mostrou que *Cryptococcus albidus* e *C. laurentii* provenientes de excretas de pombos podem apresentar importantes fatores de virulência como cápsula e melanina.

Outros estudos, mostram casos de infecção cutânea, fungemia e encefalite criptocócica por *C. albidus* em indivíduos imunossuprimidos (Burnik *et al.* 2007; Choe *et al.*, 2020; Gyimesi *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2014). *Cryptococcus laurentii* foi identificado como agente de fungemia nosocomial em paciente neutropênico associado ao uso de cateteres intravasculares e neutropenia (Khawcharoenporn; Apisarnthanarak; Mundy, 2007). Entretanto, *C. albidus* apresenta maior relação com mortalidade quando comparado com *C. laurentii* (Khawcharoenporn; Apisarnthanarak; Mundy, 2007).

Leveduras do gênero *Candida* sp. são cosmopolitas e algumas espécies podem fazer parte da microbiota de mucosas e do sistema digestivo de humanos e animais (Hallen-Adams; Suhr, 2017). Espécies de *Candida* spp. já foram isoladas em cloaca de aves (Cafarchia *et al.* 2006; Eggimann; Garbino; Pittet, 2003; Thomas-Rrdel *et al.*, 2022). *Candida albicans*, por exemplo, tem caráter oportunista e causa infecções em indivíduos imunocompetentes e principalmente, em imunocomprometidos. Neste grupo de pacientes, está associada a alta taxa de mortalidade (Calvo *et al.* 2016).

Rhodotorula sp. e *Sporobolomyces* spp. são contaminantes comuns de ambientes. Acredita-se, que o seu isolamento de excretas de aves pode ter sido devido ao contato com cimento e granito cinza das praças, local de colonização já descrito por Silva *et al.* (2022). As colônias de *Sporobolomyces* sp. e *Rhodotorula* sp. são de coloração salmão alaranjado devido a presença de carotenóides (Marova; Certik; Breierova, 2011).

Rhodotorula spp. raramente está envolvida em processos infecciosos, mas já foi descrita como agente de fungemia (infecção da corrente sanguínea), endocardites e infecções em indivíduos imunocomprometidos (Almeida *et al.*, 2008; Tuon *et al.*, 2008). É a levedura que mais se parece com *Cryptococcus* spp., dividindo características como morfologia, colônia mucóide e urease positiva. Diferente dos *Cryptococcus* spp., ela produz pigmento de cor alaranjado (Almeida *et al.*, 2008).

De forma similar, as infecções por *Sporobolomyces* spp. são raras, mas acomete indivíduos com sistema imune comprometido. De acordo com Sapkota *et al.* (2015) é comum encontrar *Sporobolomyces* spp. no ambiente em cima das folhas de plantas e conforme relatado anteriormente, em cima de granitos. Esses locais podem ser fonte de contaminação para esses indivíduos, assim como excretas de pombos no ambiente (Gugnani *et al.*, 2020).

Estudos de vigilância em decorrência de leveduras com potencial patogênico em praças e outras áreas com grande circulação de pessoas têm sido descritos em todos os continentes, incluindo Europa (De Garcia *et al.*, 2012), Ásia (Jang *et al.*, 2011), África (Litvintseva, 2005), Oceania (Malik *et al.*, 2003) e América (Abegg *et al.*, 2006; Rosário *et al.*, 2010). Apesar da relevância, existem poucos estudos no Brasil que descrevem o isolamento de *Cryptococcus* spp. em praças públicas (Anzai *et al.*, 2014; Faria *et al.*, 2010; Reolon; Perez; Mezzari, 2004). Este é o primeiro estudo que avalia a microbiota fúngica presente em amostras fecais de aves coletadas de praças

em áreas públicas de Mato Grosso do Sul. Neste sentido, o estudo aqui realizado contribui para ampliar a escassa literatura sobre o tema a nível regional, nacional e internacional.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que pombos e outras aves abrigam uma variedade de leveduras de interesse médico, como *Cryptococcus* spp., e são um reservatório de fungos patogênicos humanos, principalmente para indivíduos imunocomprometidos. A compreensão da epidemiologia ambiental desses patógenos é importante para a saúde pública, sendo necessário implementar ações de vigilância e controle da criptococose e outras infecções fúngicas. Novas pesquisas devem ser incentivadas, para caracterizar leveduras patogênicas e determinar o foco de contaminação em ambientes públicos.

REFERÊNCIAS

ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of *psittaciformes* in a southern Brazilian zoological garden. **Mycopathologia**, v.161, p.83-91, 2006.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. **World Health Organization**: Geneva, Switzerland, 2022.

ALMEIDA, G. *et al.* Acute respiratory distress syndrome due to *Cryptococcus albidus* pneumonia: case report and review of the literature. **Medical mycology**, v. 5, p. 469-473, 2007.

ALVES, G. S. B. *et al.* Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 8, p. 509-515, 2016.

ANZAI, M. C. *et al.* *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Mycoses**, v. 57, n. 7, p. 414-418, 2014.

ARYAL, Sagar. Bird Seed Agar- Composition, Principle, Preparation, Results, Uses, Limitations. Microbe Notes, 2022. Disponível em: <https://microbenotes.com/bird-seed-agar/#references>. Acesso em: 24 out. 2023.

BALTAZAR, L.M.; RIBEIRO, M.A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.5, p.449-453, 2008.

BARONI, F. A. *et al.* *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 2, p. 71-75, 2006.

BECK, P. V. **Estudo das infestações de pombos nas edificações da cidade de Brasília**. 2003. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) - Faculdade de Ciências e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília. Disponível em: <https://repositorio.uniceub.br/jspui/bitstream/123456789/2493/2/9968245.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2023.

BELLMANN, Romuald; SMUSZKIEWICZ, Piotr. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. **Infection**, v. 45, p. 737-779, 2017.

BRITO, Murilo *et al.* Isolation of *Cryptococcus* species from the external environments of hospital and academic areas. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 13, n. 06, p. 545-553, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e

identificação de fungos de importância médica. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2013. 46p, 9 v.

BRASIL. Campo Grande. Lei Complementar Nº 345, de 18 de janeiro de 2019. Altera a Lei Complementar nº 148, de 23 de dezembro de 2009, que institui o Código Sanitário Municipal no âmbito do Município de Campo Grande - MS e dá outras providências. Campo Grande, MS: 2019.

CAFARCHIA, C. *et al.* Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. **Mycopathologia**, v. 161, p. 229-234, 2006.

CALVO, Belinda *et al.* First report of *Candida auris* in America: clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. **Journal of Infection**, v. 73, n. 4, p. 369-374, 2016.

CASADEVALL, Arturo; PERFECT, John R. **Cryptococcus neoformans**. Washington, DC: ASM press, 1998.

CHANG, M. R.; PANIAGO, A. M. M.; SILVA, M. M.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B. *Prostatic cryptococcosis: a case report*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n. 2, p. 378-385, 2008.

CHEN, S. C. A. *et al.* Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. **Clinical infectious diseases**, v. 55, n. 6, p. 789-798, 2012.

CHEN, S. C. A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 980-1024, 2014.

CHOE, Young June *et al.* *Cryptococcus albidus* fungemia in an immunosuppressed child: case report and systematic literature review. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 9, n. 1, p. 100-105, 2020.

CORRÊA J., D. **Investigação de *Cryptococcus* spp. em excrementos de pombos no ambiente escolar em Campo Grande, Mato Grosso do Sul**. 2019. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

COX, Gary M. *et al.* Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and immunity**, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.

DE GARCIA, Virginia *et al.* *Cryptococcus* species (*Tremellales*) from glacial biomes in the southern (Patagonia) and northern (Svalbard) hemispheres. **FEMS microbiology ecology**, v. 82, n. 2, p. 523-539, 2012.

EGGIMANN, Philippe; GARBINO, Jorge; PITTET, Didier. Epidemiology of *Candida species* infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 11, p. 685-702, 2003.

ELLIS, D. H. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. suppl_1, p. 7-10, 2002.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1642-1644, 1990.

FARIA, R. O. *et al.* Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol. 43, n. 2 (mar./abr. 2010), p. 198- 200, 2010.

FARRER, R. A. *et al.* 2019. A new lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) discovered in the Central Zambebian Miombo Woodlands. **American Society for Microbiology**. Vol. 10, 2019.

FILIÚ, W. F. *et al.* Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.35, n. 6, p. 591-595, nov-dez. 2002.

GOODWIN, Megan L.; DREW, Richard H. Antifungal serum concentration monitoring: an update. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. 17-25, 2008.

GOMES, M. S. **Criptococose em hospital de referência em Mato Grosso do Sul: caracterização epidemiológica, fenotípica e genética**. 2011. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

GUGNANI, Harish C. *et al.* Occurrence of *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi in environmental sources in Bonaire (Dutch Caribbean). **Germs**, v. 10, n. 3, p. 195, 2020.

HAGEN, F. *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal genetics and biology**, v. 78, p. 16-48, 2015.

HALLEN-ADAMS, Heather E.; SUHR, Mallory J. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. **Virulence**, v. 8, n. 3, p. 352-358, 2017.

HEITMAN, J. *et al.* ***Cryptococcus: from human pathogen to model yeast***. ASM Press, 2011.

HiMedia Laboratories. Technical Data: Sabouraud Dextrose Agar. 2022. Disponível em: <https://www.himedialabs.com/media/TD/MH063.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2023.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Informações sobre Campo Grande, MS. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ms/campo-grande.html>. Acesso em: 09 jun. 2023.

JANG, Y. H. *et al.* Prevalence of yeast- like fungi and evaluation of several virulence factors from feral pigeons in Seoul, Korea. **Letters in applied microbiology**, v. 52, n. 4, p. 367-371, 2011.

KHAWCHAROENPORN, Thana; APISARNTHANARAK, Anucha; MUNDY, Linda M. *Non-neoformans cryptococcal* infections: a systematic review. **Infection**, v. 35, p. 51-58, 2007.

KIDD, S. E. *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17258-17263, 2004.

KORD, Mohammad *et al.* Comparison of PCR-RFLP with 21-plex PCR and rDNA Sequencing for Identification of Clinical Yeast Isolates. **Mycopathologia**, v. 186, p. 213-220, 2021.

KWON-CHUNG, K.J. *et al.* Systematics of the Genus *Cryptococcus* and Its Type Species *C. neoformans*. In: HEITMAN, J. *et al.* **Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast**. ASM Press, 2011. p. 1-15.

KWON-CHUNG, K. J. *et al.* The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. **MSphere**, v. 2, n. 1, p. e00357-16, 2017.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535-537, 1982.

LAM, Holly CY *et al.* Association between ambient temperature and common allergenic pollen and fungal spores: A 52-year analysis in central England, United Kingdom. **Science of The Total Environment**, v. 906, p. 167607, 2023.

LARONE, D. H. - **Medically important fungi**: A guide to identification. 5th ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 2011. 240p.

LINDENBERG, A. D. S. C. *et al.* Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 2, p. 75–78, abr. 2008.

LITVINTSEVA, A. P. *et al.* Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 5, p. 888-892, 2005.

LIU, Yang *et al.* *Cryptococcus albidus* encephalitis in newly diagnosed HIV-patient and literature review. **Medical mycology case reports**, v. 3, p. 8-10, 2014.

MALIK, R. *et al.* Avian cryptococcosis. **Medical Mycology**, v. 41, n. 2, p. 115-124, 2003.

MAROVA, Ivana; CERTIK, Milan; BREIEROV, Emilia. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. **Biomass - Detection, Production And Usage**, p.345-380. 2011. In Tech. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/19235>. Acesso em: 22 nov. 2023.

MEDINA, R. *et al.* Pigeons and their droppings as reservoirs of *Candida* and other zoonotic yeasts. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 34, n. 4, p. 211-214, 2017.

MEYER, W. *et al.* Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v. 47, n. 6, p. 561-570, 2009.

MEYER, W. *et al.* Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 2, p. 189, 2003.

MILLER, W. G. *et al.* *Cryptococcosis* in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**. 2002 Feb;40(2):721-4.

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.

NUNES, J. O. *et al.* Cryptococcal meningitis epidemiology: 17 years of experience in a State of the Brazilian Pantanal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 485-492, 2018.

OLSZEWSKI, Michal A. *et al.* Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761-1771, 2004.

POLACHECK, I.; HEARING, V. J.; KWON-CHUNG, K. J. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of bacteriology**, v. 150, n. 3, p. 1212-1220, 1982.

REOLON, Aline; PEREZ, Leandro R. R.; MEZZARI, Adelina. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 293-298, 2004.

ROSÁRIO, Inmaculada; ACOSTA, Begona; COLOM, M. Francisca. Pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus spp.* **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 1, p. S13-8, 2008.

ROSÁRIO, I. *et al.* Presence of *C. albidus*, *C. laurentii* and *C. uniguttulatus* in crop and droppings of pigeon lofts (*Columba livia*). **Mycopathologia**, v. 169, p. 315-319, 2010.

SAAG, Michael S. *et al.* Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 710-718, 2000.

SANTOS, H. *et al.* Estudo clínico e epidemiológico de criptococose pulmonar diagnosticada em hospital universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde (PECIBES)**. v. 1, n. 1 Supl., 2015.

SAPKOTA, Rumakanta *et al.* Host genotype is an important determinant of the cereal phyllosphere mycobiome. **New Phytologist**, v. 207, n. 4, p. 1134-1144, 2015.

SILVA C.L.R. **Cryptococcus spp. em unidades básicas de saúde de Campo Grande - MS : tipagem molecular e susceptibilidade antifúngica**. 2022. 56f. Dissertação (Mestrado em em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, Campo Grande, 2022.

SILVA, F. A. **Genética populacional e epidemiologia molecular de isolados brasileiros clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans***. Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas Mestrado em pesquisa clínica em doenças infecciosas. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/49274/000247675.pdf?sequence=2>. Acesso em: 24 mai. 2020.

SILVA, J. O.; CAPUANO, D. M. Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, nas excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 2, p. 137-141, 2008.

SILVA, N. C. *et al.* Biocontamination and diversity of epilithic bacteria and fungi colonising outdoor stone and mortar sculptures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 9-10, p. 3811-3828, 2022.

SPRINGER, Deborah J.; MOHAN, Rajinikanth; HEITMAN, Joseph. Plants promote mating and dispersal of the human pathogenic fungus *Cryptococcus*. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0171695, 2017.

TAKAHARA, D. T. *et al.* First report on *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 6, p. 371- 376, 2013.

TENCATE, L.N.; TAPARO, C.V.; CARVALHO, C. *et al.* Estudo da microbiota fúngica gastrointestinal de morcegos (*Mammalia, Chiroptera*) da região noroeste do estado de São Paulo: potencial zoonótico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.49, p.146-152, 2012.

THOMAS-RŘDDEL, Daniel O. *et al.* Risk factors for invasive *Candida* infection in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis. **Chest**, v. 161, n. 2, p. 345-355, 2022.

TSUJISAKI, Rosiane Assis de Souza. **Estudo clínico-epidemiológico e molecular da criptococose em Mato Grosso do Sul**. 2019. 104 p. **Tese de doutorado** - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

TSUJISAKI, R. A. S. *et al.* First molecular typing of cryptococcosis-causing *Cryptococcus* in central-west Brazil. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3-4, p. 267-272, 2013.

TUON, Felipe F. *et al.* *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 3, p. 135-40, 2008.

VAN DUIN, David; CASADEVALL, Arturo; NOSANCHUK, Joshua D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394-3400, 2002.

WIRTH, Fernanda; AZEVEDO, Maria Isabel; GOLDANI, Luciano Z. Molecular types of *Cryptococcus* species isolated from patients with cryptococcal meningitis in a Brazilian tertiary care hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, p. 495-498, 2018.

ZARAGOZA, G. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019

ZARAGOZA, Oscar *et al.* Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043-2057, 2008.

ZÚÑIGA, V. T. Aislamiento presuntivo y caracterización de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* desde árboles en la región de O'Higgins y Maule, Chile. **Boletín Micológico**, v. 30, n. 2, 2015.

APÊNDICE A – PREPARO DE MATERIAL

Ágar Níger

De acordo com Larone (2011), é necessário ferver 50 g de semente *Guizotia abyssinica* em béquer com 500 mL de água destilada, bater no liquidificador e ferver novamente. Filtrar com auxílio de gaze em uma proveta e completar o volume até 500 mL. Dissolver em micro-ondas 15 g de ágar bacteriológico em 500 mL de água destilada e adicionar os outros componentes à essa mistura: 10 g de glicose, 1 g de fosfato de potássio monobásico, 1 g de creatina e 0,2 g de clorafenicol. Autoclavar a 120°C por 15 min. o meio e adicionar em placas previamente esterilizadas.

Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)

O ASD foi preparado de acordo com recomendações do fabricante (HiMedia Laboratories). Pesar 65 g de ágar base para um litro de água destilada, aquecer em microondas até a dissolução total do meio. Autoclavar em frasco Schott a 120°C por 15 min. o meio e adicionar em placas de Petri previamente esterilizadas.

Ágar CGB (*Canavanine Glycine Bromothymol Blue Agar*)

Conforme Larone (2011) para solução A (L-canavanina) é necessário 10 g de glicina, 1 g de KH₂PO₄, 1 g de MgSO₄, 1 mg de tiamina HCl, 30 mg de sulfato L-canavanina para 100 mL de água destilada. Ajustar o pH da solução para 5,6 utilizando um pHmetro e corrigir se necessário com NaOH 1M ou HCl fumegante. Dentro da cabine biológica esterilizar por filtração usando membrana de 0,22 µm com auxílio da bomba de vácuo e fazer alíquotas de 25 mL em tubos de ensaio estéreis.

Para solução B (azul de bromotimol) de 100 mL é necessário 0,4 g de azul bromotimol, 64 mL de NaOH a 0,01 N e 36 mL de água destilada. Ajustar o pH da solução para 5,8 utilizando um pHmetro e corrigir se necessário. Ambas as soluções são armazenadas em geladeira se não usadas no mesmo dia.

O meio CGB para 250 mL é feito com 5 g de ágar-ágar, 5 ml da solução B em 220 mL de água destilada, autoclavar a 120°C por 15 min. e depois de resfriado

adicionar 25 mL da solução A. Distribuir 2,5 mL em tubos de ensaio estéreis para posterior uso.

Ágar uréia 40%

O ágar uréia foi preparado de acordo com recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich). Para 100 mL de solução misturar um frasco contendo 2g de uréia e 5 mL de água destilada em 95 mL de solução ágar base uréia. O ágar base utilizado foi do fabricante HiMedia Laboratories: suspender 24,01g em 950 mL de água destilada e autoclavar a 120°C por 15 min. A uréia é colocada após a autoclavagem por ser termolábil, sendo necessário misturar e colocar em tubos de ensaio estéreis.

Meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*)

Conforme Larone (2011) foi pesado 0,67 g de base nitrogenada e 20 g de ágar para um litro de água destilada. Misturar a solução e autoclavar a 120°C por 15 min.