IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptococcus neoformans* EM EXCRETAS DE *Columba livia* QUE FREQUENTAM O HOSPITAL PÚBLICO DE PALMAS – TO

IDENTIFICATION OF *Cryptococcus neoformans* IN EXTRACTORS OF COLUMBA LIVIA THAT FREQUENT THE PUBLIC HOSPITAL OF PALMAS - TO

SAMPAIO, Jéssica Soares^{1*}; GELLEN, Luís Fernando Albarello²; ALEXANDRE, Maria de Assis Cruz³;

^{1,2,3} Centro Universitário Luterano de Palmas, Faculdade de Biomedicina, Laboratório de Microbiologia e Micologia, Avenida Teotônio Segurado 1501 Sul, cep 77.019-900, Palmas – TO, Brasil
(fone: +55 63 3219 8000)

* Jéssica Soares Sampaio
e-mail: sampaio.jessicaa@gmail.com

Received 23 July 2018; received in revised form 08 September 2018; accepted 10 September 2018

RESUMO

No Brasil, as micoses vêm ganhando grande importância epidemiológica, devido ao aumento progressivo das taxas de morbidade e mortalidade. Em muitos lugares, o pombo já atingiu condições de pragas urbanas em razão de sua superpopulação se tornando um problema mundial que representa sérios riscos à saúde pública. Dentre os principais causadores de micoses provenientes dos pombos, destaca-se o *Cryptococcus* spp. esta espécie é o principal causador da criptococose, que ocorre a partir da inalação dos propágulos fúngicos que se dispersam pelo ar. Este trabalho objetivou a identificação de *Cryptococcus neoformans* em excretas de *Columba livia* que frequentam o Hospital Público de Palmas (HPP) para a verificação dos riscos de transmissão. Os resultados foram baseados na identificação dos pontos de maior frequência do pombo como no setor de quimioterapia (A) e no setor de emergência (B e C). A metodologia para identificação do *C. neoformans* foi amparada na avaliação da cultura macroscópica, microscopia e teste bioquímico. De 30 amostras identificadas, 3,3% no ponto A, 13,3% no ponto B, e 3,3% no ponto C foram positivas sendo observado, portanto, a presença do *C. neoformans* em grande porcentagem no setor de emergência do HPP, o que o torna um ambiente propício para a propagação da levedura.

Palavras-chave: Criptococose. Saúde Pública. Columbidae.

ABSTRACT

In Brazil, the mycoses have been winning great epidemiological importance, due to the progressive rate of morbidity and mortality. In many places, the pigeon has already reached urban pest conditions because of its overpopulation becoming a worldwide problem, which poses serious public health risks. Among the main causes of mycosis from pigeons, we highlight *Cryptococcus* spp. this species is the main cause of cryptococcosis, which occurs from the inhalation of fungal propagules that disperse through the air. This work aimed at the identification of *Cryptococcus neoformans* in excreta of *Columba livia* who attend the Public Hospital of Palmas (HPP) to verify transmission risks. The results were based on the identification of the most frequent points of the pigeon as in the chemotherapy sector (A) and in the emergency sector (B and C). The methodology for identification of *C. neoformans* was supported by the evaluation of macroscopic culture, microscopy and biochemical test. Of 30 samples identified, 3.3% at point A, 13.3% at point B, and 3.3% at point C were positive being observed, therefore, the presence of *C. neoformans* in a large percentage in the HPP emergency sector, which makes it an environment conducive to the propagation of yeast.

Keywords: Cryptococcosis. Public health. Columbidae.

INTRODUÇÃO

Segundo Tortora, Funke e Case (2012), fungos são organismos que possuem, metabolismo limitado a heterotrófico, aeróbico e anaeróbico facultativo. Tem a capacidade de parasitar e colonizar o homem e os animais, parasitismo este dependente da deficiência imunológica do hospedeiro, podendo causar diversos quadros infecciosos, chamados de micoses, com formas clínicas localizadas ou disseminadas (Brasil, 2004). No Brasil, as micoses têm grande importância epidemiológica e terapêutica, tornando-se um problema de saúde pública que reflete o nível de educação sanitária da população (Arenas; Esmenjaud, 2004).

Algumas pessoas possuem maior facilidade para o desenvolvimento de um quadro clínico ocasionado por micoses. Pacientes com diabetes, e Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), assim como a utilização de fármacos imunossupressores e antibióticos, são alvos fáceis dos agentes fúngicos, pelo estado debilitado que se encontra o paciente. No ambiente hospitalar as infecções fúngicas passaram a ter uma grande importância nos últimos anos, devido ao aumento progressivo das taxas de morbidade e mortalidade (Martins-Diniz *et al.*, 2005; Somenzi; Ribeiro; Menezes, 2006).

Neste contexto, a progressão de infecções fúngicas se dá pelo crescimento demográfico de alguns vetores, em especial os pombos, que tem um papel importante na contaminação do meio ambiente e na dispersão de patógenos através da deposição de suas excretas. O comportamento e a intensa aproximação dos pombos a população é o maior agravante deste animal, devido a quantidade de microrganismos patogênicos, como fungos, ácaros e parasitos (Reolon; Perez; Mezzari, 2004).

Segundo Pemán, Zaragoza e Salavert (2013), os grupos de microrganismos causadores de infecções fúngicas invasivas hospitalares vem aumentando gradativamente, no entanto o *Cryptococcus* spp. encaixa-se como o patógeno oportunista mais habitual entre os fungos leveduriformes de interesse médico.

O *Cryptococcus neoformans* tem a capacidade de colonizar a mucosa do papo dos pombos, e por meio da excreção, liberam o fungo ao ambiente, vivendo saprofiticamente em seus

excrementos. Além da grande capacidade de adaptação e de sua prolificidade, o principal problema é que o *C. neoformans* permanece viável nas fezes secas dessa ave durante aproximadamente dois anos, tornando-se um reservatório de partículas infectantes passíveis de inalação (Baroni *et al.*, 2006).

Pertencente ao Filo *Basidiomycota*, Ordem *Sporidiales* e Família *Sporidiobolaceae*. *C. neoformans* apresenta-se na forma leveduriforme quando em estágio parasitário ou ambiental (*Cryptococcus*), e na forma filamentosa em determinadas condições ambientais (*Filobasidiella*) (Kwon-Chung; Bennett, 1992; Sia; Lengeler; Heitman, 2000; Tucker; Casadevall, 2002).

Sua patogenicidade está ligada à sua infectividade, ou seja, a capacidade desta levedura de infectar humanos e animais. Entre os fatores de virulência pode-se destacar a facultativa patogenicidade intracelular, e a presença de uma cápsula polissacarídica com atividade antifagocítica, tendo sua importância demonstrada pela observação de mutantes acapsulares de *C. neoformans* que raramente causa a doença (Kwon-Chung; Bennett, 1992; Chang; Penoyer; Kwon-Chung, 1996; Alspaugh; Perfect; Heitman, 1998; Feldmesser; Tucker; Casadevall, 2001).

Ainda a produção de urease são fatores que se destacam como capacidade infectante, a alteração de cor do meio ocorre pela alcalinização do meio pelo produto da hidrólise da ureia, pois esta levedura utiliza ureia pela ação da enzima, características estas que auxiliam para a identificação do *C. neoformans* (Wang; Aisen; Casadevall, 1995; Cox *et al.*, 2000; Tucker; Casadevall, 2002).

A infecção em humanos por *C. neoformans* está relacionada com a disfunção da imunidade inata do hospedeiro, pela inalação de pequenas partículas, basidiósporos (3µm) ou blastoconídios (4 a 5µm) presentes no ambiente, podendo, inicialmente, causar infecção sintomática ou assintomática na área subpleural dos pulmões, ou permanecer dentro de um granuloma em estado latente (Mitchell; Perfect, 1995; Casadevall; Perfect, 1998; Lacaz *et al.*, 2002).

Esta espécie é o principal agente da criptococose, considerada a mais importante das infecções fúngicas no nosso país. A Criptococose é a doença causada pelo

Cryptococcus spp., a infecção ocorre a partir da inalação dos propágulos fúngicos que se dispersam pelo ar, sendo o pulmão o sítio anatômico primário da infecção, podendo se disseminar para o SNC (Reolon; Perez; Mezzari, 2004).

Em meados de 2000, a Criptococose assumiu um papel relevante, por ser considerada uma das micoses mais comuns em pacientes imunocomprometido, particularmente nos portadores da AIDS, acometendo principalmente o sistema nervoso central (Fernandes *et al.*, 2000).

O principal veículo de contaminação por fungos nos seres humanos ocorre através de fezes nitrificadas, ou seja, fezes de aves, em específico de pombos, onde o fungo permanece viável para contágio por um período de até dois anos. O *C. neoformans* tem a capacidade de colonizar a mucosa do papo dos pombos sem causar doença, pois se trata de um parasita natural a estas aves (Oliveira, 2014). Quando existe uma grande concentração de pombos em determinada área, além do problema estático e da sujeira no local, considera-se um risco potencial à saúde pública (Kahn *et al.*, 2012).

A existência de populações numerosas de pombos em centros urbanos é um problema mundial que representa risco à saúde pública devido às zoonoses que podem transmitir (Leal *et al.*, 2015). Em muitos lugares, o pombo doméstico já atingiu a condição de praga urbana, em razão de sua superpopulação, seus prejuízos econômicos e os riscos que representa à saúde pública, sendo necessário o seu controle populacional (Nunes, 2003).

Locais onde há acúmulo de excretas de aves servem como importante fonte de infecção do *C. neoformans* para a população que os frequenta, aumentando o risco de adquirir a doença devido a uma maior concentração de propágulos fúngicos infectantes presentes nestes ambientes (Reolon; Perez; Mezzari, 2004). Este acúmulo de fezes de pombos pode favorecer a inalação de microrganismos, durante os procedimentos de limpeza ou pelo deslocamento da ave em correntes de ar, na forma de redemoinhos chamados anéis vorticiais (Passoni, 1999; Nunes, 2003). As excretas de aves são ricas fontes de nitrogênio, como ureia e creatinina, oferecendo condições adequadas ao desenvolvimento deste fungo. Além disto, as aves servem como carreadoras, transportando a levedura em suas penas, patas e bicos (Lin,

2009). O objetivo desse trabalho foi pesquisar e identificar *C. neoformans* em excretas de *C. livia*, e verificar o risco da presença dessa ave para o ambiente hospitalar, tendo em vista que os frequentadores são pessoas debilitadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 30 amostras de excretas secas de *C. Livia* (10 amostras por três dias em três locais distintos do ambiente externo do HPP), utilizando como critério os pontos com maior presença de pombos e fluxo de pessoas (Figura 1). Todas as amostras foram recolhidas com espátula esterilizada, acondicionadas em frascos estéreis com tampa e transportadas imediatamente para o Laboratório de Microbiologia do CEULP/ULBRA onde foram processadas (Filiú *et al.*, 2002).

Figura 1: Vista superior do HPP. A: Setor de Quimioterapia; B: Área esquerda do setor de emergência; C: Área direita do setor de emergência. (Fonte: Google Earth, 2017).

Iniciou-se o processamento do material em câmara de fluxo laminar, onde cerca de 1g do material foi suspenso em 50mL de solução salina estéril contendo 0,4g/l de cloranfenicol em tubo falcon de 50mL. Agitou-se em vórtex por 3 minutos a 2000 rpm, e deixando em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente para realização da semeadura (Filiú *et al.*, 2002).

Retirou-se 0,1mL do sobrenadante aspirado que foi semeado em placas de petri com meio ágar Sabouraud dextrosado a 2%, utilizando alça de transferência estéril, e a técnica de varredura de alça (Filiú *et al.*, 2002).

Foram semeadas 10 placas por amostra, sendo incubadas à temperatura ambiente, entre 26 e 27,5°C e observadas novas colônias diariamente por um período de 7 dias (Filiú *et al.*, 2002; Contin *et al.*, 2011).

As colônias aparentemente lisas, úmidas, brilhantes e de coloração creme foram repicadas na forma de estrias simples em placas contendo ágar Sabouraud 2%, em seguida incubadas em estufa à temperatura de 30°C e observadas por 7 dias (Filiú *et al.*, 2002; Contin *et al.*, 2011), realizando em seguida a análise microscópica das colônias e submissão às provas de identificação.

Após crescimento, foram realizados os testes microscópicos, segundo Reolon, Perez e Mezzari (2004), em montagens de lâmina com a cultura fúngica, suspensas com uma gota de tinta nanquim, sobrepondo-a com uma laminula. Foram observadas as características morfológicas em microscópio óptico e em seguida, realizou-se a prova bioquímica da urease, inoculando com a colônia fúngica encontrada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 30 amostras coletadas, 6 (20%) foram positivas para a levedura *C. neoformans*. Foram observados crescimentos nos três pontos coletados no HPP, escolhidos de acordo com a frequência dos pombos no local e a presença das excretas. O ponto A referente ao setor de quimioterapia, apresentou 3,3% de positividade para *C. neoformans*; O ponto B, a área esquerda do setor de emergência, apresentou 13,3% de positividade e no ponto C, área direita do setor de emergência, foi observado 3,3% de positividade.

Estudos feitos por Lima, Klafke e Xavier (2015) no Campus Saúde da Universidade Federal do Rio Grande obtiveram 32,5% de positividade em 40 amostras de excretas de pombos. Valores semelhantes também foram encontrados por Mezzari *et al.* (2014) nos Hospitais de Porto Alegre.

Nos pontos de coleta, foram observados a sujeira do local, quantidade de excretas e prevalência de pombos. No local onde foi encontrada maior quantidade do *C. neoformans*, percebeu-se o acúmulo de sujeira, maior quantidade de excretas e maior prevalência de

pombos (Figura 2). A presença da levedura comprova que, em locais onde há acúmulo excessivo de excretas, é possível melhor reprodução dos resultados, e a menor prevalência dos isolados em outros pontos pode demonstrar a necessidade de uma maior amostragem ou monitoração do local (Egres, 2010).

Figura 2: Presença e sujeira do ambiente externo do HPP. (Fonte: Acervo próprio).

Também na instituição estudada, foi observado o acúmulo de excretas depositadas nos telhados, nos beirais e nas centrais de ar condicionado. sua arquitetura proporciona espaços adequados para pouso e abrigo de animais. Em 1959, Littman descreveu caso de estudante de medicina que desenvolveu meningite criptocócica possivelmente resultado da exposição ao ar condicionado contaminado com excretas de *C. livia*. Mediante isso, pode-se associar a exposição das pessoas que frequentam o local com o ambiente de risco do mesmo.

Os seis isolados das excretas de pombos foram examinados macroscopicamente pela caracterização de suas colônias cremosas, lisas e de coloração creme, assim como relatado por Campos *et al.* (2009), sendo posteriormente isoladas e submetidas à provas de identificação (Figura 3).

Figura 3: Macroscópica de *C. neoformans* caracterizado por pelas colônias cremosas, lisas e de coloração creme. (Fonte: acervo próprio)

As provas de identificação microscópica com tinta nanquim, para visualização da presença da cápsula polissacarídica, foram positivas para todos os isolados selecionados de acordo com as características macroscópicas da colônia (Figura 4).

Figura 4: Identificação microscópica com tinta nanquim para visualização da cápsula polissacarídica. (Fonte: acervo próprio)

Segundo estudos realizados por Bulmer *et al.* (1967), a produção da cápsula polissacarídica é o primeiro fator de virulência conhecido em *C. neoformans*. Estando o paciente com o sistema imunológico debilitado,

mesmo os acapsulados podem causar doenças, entretanto as linhagens encapsuladas possuem maior facilidade de se disseminar no cérebro, induzindo resposta celular mais significativa nos pulmões (Casadevall; Perfect, 1998; Steenbergen; Casadevall, 2003).

Os testes de urease comprovaram a presença do *C. neoformans*, obtendo resultados positivos com a mudança da cor do meio (Figura 5). A produção de urease é uma prova bioquímica utilizada para identificação do gênero, pois as espécies de *Cryptococcus* são capazes de realizar hidrólise da ureia. A urease é a enzima responsável pela hidrólise da ureia em amônia e carbamato e o fungo *C. neoformans* produz esta enzima em grandes quantidades (Casadevall; Perfect, 1998; Cox *et al.*, 2000).

Figura 5: Teste de urease positiva para *C. neoformans* confirmado pela mudança de cor. (Fonte: acervo próprio)

Os locais dos achados em questão são preocupantes pela gravidade dos pacientes que o frequentam, o setor de quimioterapia e emergência recebem não só pacientes debilitados, mas seus acompanhantes e funcionários do hospital, que também correm o risco da inalação de propágulos do *C. neoformans* disperso no ambiente. Um indivíduo sadio ao inalar propágulos do fungo pode não reagir de forma ativa ao sistema imunológico, mas quando o torna imunocomprometido o fungo

então adormecido, se torna latente, invadindo o SNC do indivíduo, representando a forma mais severa da criptococose (Egres, 2010).

A maioria desses estudos é executada em unidades de tratamento intensivo, unidade cirúrgica, enfermagem hematológica, maternidade e outras unidades de riscos de infecção, entretanto, poucos estudos correlacionam os níveis de contaminação fúngica ambiental que podem transmitir algum tipo de doença nos pacientes e no corpo funcional (Li, 2003). O grau de contaminação no ambiente hospitalar pode mudar drasticamente em combinação com diversos fatores, aos quais a presença de construções, o uso de sistemas de climatização artificial que não protegem contra os fungos, fazendo com que os propágulos fúngicos se desloquem para longas distâncias, sendo inaladas pelo homem (Perdelli *et al.*, 2006).

Esse estudo comprova a presença do *C. neoformans* no ambiente externo do HPP, podendo ser observada durante a coleta a sujeira do local e a presença dos pombos circulando livremente com os usuários e funcionários. Com isso, fica evidente a necessidade de medidas de controles efetivas para a prevenção de doenças causadas pelo *C. neoformans* e o controle do *C. livia* em ambiente hospitalar a partir dos resultados obtidos em locais considerados de risco.

CONCLUSÕES

O estreito contato de humanos e essas aves em área hospitalar indicam um risco potencial à saúde pública, devido a exposição dos frequentadores do local, profissionais da área, profissionais de limpeza e principalmente aos pacientes imunocomprometidos, que correspondem a um grupo de risco para desenvolver criptococose.

Os locais dos achados fúngicos são preocupantes, onde há uma maior frequência de pacientes imunocomprometidos, como setor de quimioterapia e de emergência, que constituem a categoria mais exposta aos riscos de infecção relacionado a esta problemática.

O aumento da população de pombos no HPP ocorre devido às condições adequadas para sua sobrevivência, como estrutura física da construção, tornando-se o ambiente ideal para construção de ninhos e matéria orgânica disponível, como lixos e lanchonetes a céu

aberto.

Os resultados trazem em questão a importância da minimização dos riscos, e a necessária precaução a partir de medidas de controle efetivo das aves, a fim de prevenir a transmissão de doenças e a disseminação do agente no ambiente, ressaltando-se a necessidade de medidas educativas a população, no sentido de não alimentar os pombos em áreas públicas.

Todas as medidas preventivas em relação aos pombos são efetivas em um curto prazo. O abatimento, por exemplo, é uma medida preventiva que é necessária a autorização dos órgãos responsáveis, mas é uma medida temporária, pois os pombos irão se reproduzir o que irá aumentar a quantidade outra vez. A administração de anticoncepcionais é uma medida viável, mas requer recursos e tempo para a população de pombos diminuir, pois sua média de vida nas cidades é de 3 a 5 anos. As medidas que podem ser solucionadas são o controle da alimentação, ou seja, não alimentar os pombos e recolher a matéria orgânica disponível, e a mudança na estrutura do local, impedindo o acesso das aves nas construções, fechando os locais com telas ou alvenarias, após uma desinfecção do local. Assim, iremos diminuir a população de pombos com uma melhor perspectiva.

REFERÊNCIAS

1. ALSPAUGH, J.A.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* v.25, p.114, 1998.
2. ARENAS, J.; ESMENJAUD, J.R. Onychomycosis in childhood: a current perspective with emphasis on the review of treatment. *An. bras. dermatol.* v.79, n.2, p.225-232, 2004.
3. BARONI, F.A.; PAULA, C.R.; SILVA É.G.; VIANI, F.C.; RIVERA, I.N.G.; OLIVEIRA, M.T.B.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. *Rev. do Inst. de Med. Trop. de SP*, v.48, n.2, p.71-75, 2006.
4. BRASIL. Detecção de fungos de

- importância médica. Brasília: Anvisa, 2004.
5. BULMER, G.S.; SANS, M.D.; GUNN, C.M. *Cryptococcus neoformans* I. Nonencapsulated Mutants. *J. Bacteriol.*, v.94, p.1475-1479, 1967.
 6. CAMPOS F.L.; PEREIRA J.R.; SILVA M.V.; SANTOS B.C.P; BARONI F.A. Isolamento de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* de sistema nervoso central de cães na cidade do Rio de Janeiro. *Acta Sci. Vet.*, v.37, n.4, p.351-355, 2009.
 7. CASADEVALL A.; PERFECT J.R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press, 1998.
 8. CHANG, Y.C.; PENOYER, L.A.; KWON-CHUNG, K.J. The Second Capsule Gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, Is Essential for Virulence. *Infect Immun*, v.64, n.6, p.1977-1983, 1996.
 9. CONTIN, J.T.; QUARESMA, G.S.; SILVA, E.F.E.; LINARDI, V.R. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG – Brasil. *Rev. Méd. de MG*, v.21, n.1, p.19-24, 2011.
 10. COX G.M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G.T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun*; v.68, n.2, p.443-448, 2000.
 11. EGRES, C.C. Isolamento ambiental de *Cryptococcus* spp em hospital de Porto Alegre - RS. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
 12. FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends In Microbiology*, Usa, v.9, n.6, p.273-278, jun. 2001.
 13. FERNANDES, O.F.L; COSTA, T.R; COSTA, M.R; SOARES, A.J; PEREIRA, A.J.S.C; SILVA, M.R.R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.* v.33, p.75-78, 2000.
 14. FILIÚ, W.F.O; WANKE, B.; AGUENA, S.M.; VILELA, V.O; MACEDO, R.C.L; LAZÉRA, M. Cativo de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.* v. 35, n.6, p.591-595, dez. 2002.
 15. KAHN, R.E.; MOROZOV, I.; FELDMANN, H.; RICHT, J.A. 6th International Conference on Emerging Zoonoses. *Zoonoses And Public Health*, v.59, p.2-31, set. 2012.
 16. KWON-CHUNG K.J.; BENNETT J.E. *Cryptococcosis.*, Medical Mycology, Lea & Febiger, Philadelphia, p.397-446, 1992.
 17. LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACARI, E. M. & MELO, N. T. *Tratado de Micologia Médica*. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
 18. LEAL, D.C.; NEGRÃO, V.B.; SANTOS, F.; RASO, T.F.; BARROUIN-MELO, S.M.; FRANKE, C.R. Ocorrência de *Chlamydomonas psittaci* em pombos (*Columba livia*) na cidade de Salvador, Bahia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.67, n.3, p.771-776, jun. 2015.
 19. LI C.S.; HOU P.A. Bioaerosol characteristics in hospital clean rooms. *Sci Total Environ*, v.305, p.169-176, 2003.
 20. LIMA, C.T.; KLAFKE, G.B.; XAVIER, M.O. *Cryptococcus* spp. em excretas de *Columba livia* (pombos domésticos) provenientes de um Hospital Universitário no Sul do Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.82, p.1-4, 2015.
 21. LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, v.9, n.4, p.401-416, jul. 2009.
 22. LITTMAN, M. L.; TSUBURA, E. Encapsulation and virulence of *C. neoformans*: effect of degree of encapsulation upon virulence of

Cryptococcus neoformans. New York: Dept. Of Microbiology, p.774-777, 1959.

23. MARTINS-DINIZ, J.N.; SILVA, R.A.M.; MIRANDA, E.T.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. *Revista Saúde Pública*, Araraquara, v.3, n.39, p.398-405, 2 fev. 2005.
24. MEZZARI, A.; WILLEBELLING, A.M.P.; WENCZENOVICZ, C.; SOUZA, C.D.A.; FREITAS, G.S.O.; BARBOZA, L.D.; PENA, L.D.; KISSMANN N.; PORTICH, J.P.; CARNEIRO, L.C.; BEHAR, P.R.P. Presença do *Cryptococcus* spp. nas excretas de pombos nos arredores de Hospitais de Porto Alegre. *Rev Panam Infectol*, Porto Alegre, v.16, n.3, p.153-160, 10 jul. 2014.
25. MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Clin Microbiol*, v.8, n.4, p.515-548, 1995.
26. NUNES, V.F.P.; Pombos urbanos: o desafio de controle. *Biológico*; n.65, v.1-2, p.8992, 2003.
27. PASSONI, L.F.C. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. *Rev Iberoam Mico*, Rio de Janeiro, v.1, n.16, p.77-81, jun. 1999.
28. PEMÁN, J.; ZARAGOZA, R.; SALAVERT, M. Control y prevención de las infecciones nosocomiales y asociadas a cuidados sanitarios causadas por especies de *Candida* y otras levaduras. *Rev Esp Quimioter*, Valencia, v.4, n.26, p.298-311, jun. 2013.
29. PERDELLI, F.; CRISTINA, M.L.; SARTINI, M.; SPAGNOLO, A.M.; DALLERA, M.; OTTRIA, G.; LOMBARDI, R.; GRIMALDI, M.; ORLANDO, P. Fungal contamination in hospital environments. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v.27, p.22-27, 2006.
30. REOLON, A.; PEREZ, L.R.R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Jor. Bras. de Pat. e Med. Lab.* v.40, n.5, p.293-298, out. 2004.
31. SIA, R.A.; LENGELER, K.B.; HEITMAN, J. Diploid Strains of the Pathogenic Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* Are Thermally Dimorphic. *Fungal Genetics And Biology*, v.29, n.3, p.153-163, abr. 2000.
32. STEENBERGEN, J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect*, v.5, p.667-675, 2003.
33. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 10ª Edição. Porto Alegre. Editora Artmed. 2012.
34. TUCKER, S.C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, n.5, p.31653170, 2002.
35. WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* Melanin and Virulence: Mechanism of Action. *Infection And Immunity*, New York, v.63, n.8, p.31313136, ago. 1995.