

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ISOLAMENTO AMBIENTAL DE *CRYPTOCOCCUS* spp EM HOSPITAL  
DE PORTO ALEGRE-RS**

Dissertação de Mestrado

CLÁUDIA COUTINHO EGRES

Porto Alegre, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

**ISOLAMENTO AMBIENTAL DE *CRYPTOCOCCUS* spp EM HOSPITAL  
DE PORTO ALEGRE-RS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre

CLÁUDIA COUTINHO EGRES

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2010

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com apoio financeiro do Ministério da Saúde – PPSUS – CNPq- FAPERGS.

A Deus, por permitir chegar até  
aqui, estando sempre ao meu  
lado.

A minha mãe Rose Marie, pelo  
amor incondicional que sempre  
dedicou, em todos os momentos  
da minha vida,

Ao meu marido Cláudio, pela  
compreensão e apoio nesta etapa  
da vida

Amo vocês

## **Agradecimentos**

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Marilene Vainstein, pela oportunidade e orientação.

Aos professores Henrique Ferreira e Augusto Schrank, membros da comissão de acompanhamento, pelas sugestões e críticas sempre construtiva.

A minha grande amiga e colaboradora Simone Soares.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia que de alguma maneira estiveram presentes em momentos de desânimo.

Ao Dr. José Procópio Senna que sempre esteve presente na solução das minhas dúvidas moleculares.

Aos funcionários da esterilização, em especial ao Sr. Milton sempre pronto a ajudar.

Aos secretários da Pós Graduação, Silvia Centeno e Luciano Saucedo pela atenção e disponibilidade.

Aos demais colegas do PPGBCM, pelo auxílio nesse período.

A todos os funcionários da Instituição em estudo pela colaboração, disponibilidade e compreensão.

E a todos que de uma forma participaram no percurso deste trabalho

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS e UNIDADES	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1. <i>Cryptococcus</i> e CRIPTOCOCOSE	1
1.1.1. <i>Cryptococcus</i> e Ambiente hospitalar	1
1.1.2. Nichos ambientais	4
1.1.3. Etiologia e Epidemiologia molecular	6
1.1.4. Diferenciação morfológica e bioquímica de <i>Cryptococcus</i>	7
1.1.5. A infecção por <i>Cryptococcus spp</i>	9
1.1.6. Fatores de virulência	11
1.2. ABORDAGEM GERAL DA QUALIDADE DO AR INTERIOR	13
1.2.1. Contaminação fúngica em ambiente hospitalar	15
1.2.2. Compostos inorgânicos (CO <sub>2</sub> )	17
1.2.3. Indicadores da qualidade do ar e eventos adversos	17
1.2.4. Amostragem do ar	18
2. <u>JUSTIFICATIVA</u>	20
3. <u>OBJETIVOS</u>	21
3.1. Objetivos Específicos	21
4. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	22
4.1. Origem dos Isolados	22
4.2. Coleta e processamento das Amostras	22
4.2.1. Excretas de pombas	22
4.2.2. Ar ambiente	24
4.3. Análise microbiológica quantitativa	25
4.3.1. Amostras de excretas	25
4.3.2. Amostras de ar	25
4.4. Caracterização dos Isolados	25
4.5.1. Caracterização Bioquímica	25
4.5.1.1. Cultivo em Agar Níger	25
4.5.1.2. Testes de cápsula polissacarídica	26
4.5.1.3. Produção de Urease	26
4.5.1.4. Cultivo em Canavanina-Glicina–Azul de bromotimol	26
4.6. Caracterização Molecular	27
4.6.1. Extração de DNA	27

4.6.2. Determinação de <i>Mating Type</i>	27
4.6.3. PCR-Multiplex para determinação de espécies	28
4.6.4. Determinação de Genótipos por <i>URA5-RFLP</i>	29
5. <u>RESULTADOS e DISCUSSÃO</u>	30
5.1. Amostragem das excretas de pombos	30
5.2. Caracterização bioquímica	34
5.3. PCR-Multiplex para determinação de espécies	36
5.4. Determinação de Genótipos por <i>URA5-RFLP</i>	37
5.5. Determinação de <i>Mating Type</i>	40
5.6. Amostragem do ar interno	40
6. <u>CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS</u>	51
7. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	53

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS e UNIDADES

% - por cento

° - grau

°C - grau Celsius

AFPL - polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CGB - Ágar Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleosídeo(s) Trifosfato(s)

EDTA - Ácido Etileno-Diamino-Tetra-Acético

g – grama

GalXM – Galactoxilomanana

GXM - Glucoronoxilomanana

HCl - ácido clorídrico

HIV - Vírus Da Imunodeficiência Humana

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

M - molar

MAT - tipos de acasalamento - *mating types*

Mb – Milhões de pares de bases

mg - miligrama

mL - mililitro

mM - milimolar

NaCl - Cloreto de Sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

ng - nanograma

pb - pares de bases

PCR - Reação em Cadeia da DNA Polimerase

pH - Potencial Hidrogeniônico

PLB1 - fosfolipase 1

pmol - picomol

RAPD - DNA polimórfico amplificado ao acaso

RFLP - polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição

RNAse - Ribonuclease

SDS – Dodecil sulfato de Sódio



SNC - Sistema Nervoso Central

sp - espécie

spp - espécies

TENTS - TrisHCl-EDTA-NaCl-Triton X-100-SDS

UFC – Unidade Formadora de Colônias

µg – micrograma

µL – microlitro

µm - micromolar

UV – Ultravioleta

URA5 - Ortidina Monofosfato Pirofosforilase

var - Variedade

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Evolução do complexo de espécies <i>Cryptococcus neoformans</i>	4
<b>Figura 2.</b> Características que permitem diferenciar <i>Cryptococcus neoformans</i> de outros fungos	8
<b>Figura 3.</b> Ciclo de infecção de <i>Cryptococcus</i> spp.	10
<b>Figura 4.</b> Diferenças no tamanho da cápsula de <i>Cryptococcus neoformans</i> em condições naturais e clínica	12
<b>Figura 5.</b> Local amostrado. A. Visualização aérea; B. Fachada lateral interna da Área Amostrada em segmento contínuo	23
<b>Figura 6.</b> Amostrador microbiológico de ar (A) e Analisador físico (B)	24
<b>Figura 7.</b> Colônias isoladas presuntivas de <i>Cryptococcus</i> spp (colônias marrons) e de outros fungos	31
<b>Figura 8.</b> Fonte orgânica de contaminação ambiental	32
<b>Figura 9.</b> Caracterização Bioquímica. A: melanização (colônias marrons); B: urease positiva, e C: quimiotipagem por CGB	34
<b>Figura 10.</b> Espécies de <i>Cryptococcus</i> identificadas por PCR-Multiplex	37
<b>Figura 11.</b> <i>URA-5</i> RFLP- Isolados Ambientais	39
<b>Figura 12.</b> Amplificação de PCR para determinação do <i>mating type</i>	39
<b>Figura 13.</b> Amostragem do ar utilizando como marcador epidemiológico o número de fungos viáveis	44
<b>Figura 14.</b> Relação umidade e crescimento fúngico	45
<b>Figura 15.</b> Placas com crescimento fúngico dos ambientes amostrados com 100 L/ m <sub>3</sub> de Ar	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número de colônias presuntivas de <i>Cryptococcus</i> spp isoladas de excretas pombas no inverno e no verão	30
<b>Tabela 2:</b> Umidade Relativa e concentração de CO <sub>2</sub> nos ambientes	49

## RESUMO

Leveduras do gênero *Cryptococcus* estão presentes na natureza em diversos locais, associadas a restos vegetais e orgânicos. Ocasionalmente ocorre a aerolização destes propágulos que podem causar infecção humana por inalação destas partículas. O objetivo deste estudo foi identificar a ocorrência de espécies do Complexo *Cryptococcus* em matéria orgânica e ar interno em ambiente hospitalar. Neste projeto, um total de 60 amostras de excretas de pombos na área externa e 216 amostras de ar de ambiente interno de um Hospital de Porto Alegre foi analisado. Na amostragem microbiológica de ar, a levedura não foi encontrada, entretanto 33% das amostras de excretas de pombos apresentaram positividade para *Cryptococcus neoformans*. Dos 2015 isolados de *Cryptococcus* presentes nas excretas de pombos, 238 foram selecionados para delinear o perfil molecular e bioquímico. O genótipo destes isolados foi analisado por RFLP com dupla digestão, fundamentado no gene URA5. A determinação do feromônio *Mat*  $\alpha$  e *Mat* a foi amplificado por PCR direto, e para análise de variedade das espécies foi utilizado o método PCR-Multiplex. A presença da cápsula e melanização também foi observada. Todos os isolados foram sorotipo A (Var. *grubii*), genótipo VNI e *Mat*  $\alpha$ .

## ABSTRACT

Yeasts from the *Cryptococcus* genus are present in multiple locales in nature associated to vegetal and organic remains. Occasionally these airborne particles are inhaled by humans, which could lead to infection. In this research, a total of 60 samples from pigeon droppings in the outside area, and 216 samples of indoor air were analyzed. This study aims identifying the occurrence of the *Cryptococcus* complex species in organic matter and indoor air in a hospital in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul state, Brazil. In the microbiological air sampling, the yeast was not recovered; however, 33% of the excreta samples were positive for *Cryptococcus*. From the 2.015 isolates of *Cryptococcus* present in pigeon droppings, 238 were selected to outline molecular and biochemical profiles. The genotype of these isolated samples was analyzed through RFLP with double digestion, based on the URA5 gene. The determination of *Mating type*  $\alpha$  e *Mating type* a pheromones was amplified through direct PCR, while for the species variety analysis the PCR-Multiplex method was used. The capsule and melanization presence was also noted. All isolates were Serotype A (*Var. grubii*), VNI genotype and *Mating type*  $\alpha$ .

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Cryptococcus* e CRIPTOCOCOSE

A associação entre *Cryptococcus neoformans* e pombos tem sido relatado freqüentemente (RUIZ, 1981; STAIB, 1981; CASADEVALL & PERFECT, 1998; REOLON, 2004; SOARES, 2005; NIELSEN *et al* 2007). Contudo essas aves não adquirem criptococose provavelmente porque esta levedura não consiga se desenvolver na temperatura corpórea de 42°C. No entanto, esta levedura pode sobreviver no trato intestinal dos pombos e seus esporos podem permanecer viáveis por até 2 anos em excretas de pombos úmidas e secas protegidas do sol (DENTON, 1968; LITTMAN, 1968).

O isolamento de *C. neoformans* de solos, especialmente aqueles contaminados com excretas de pombos, onde o fungo permanece viável, fundamentou o conceito de que a infecção tem origem ambiental (EMMONS, 1951; EMMONS, 1960). A presença de pombos nas proximidades de hospitais ou a presença freqüente na área hospitalar é considerada grave, estando em desacordo com os padrões sanitários recomendados a ambientes de assistência à saúde, principalmente pela possível transmissão de criptococose.

A criptococose, quando infecção oportunista atinge pulmões, sistema nervoso central e doença disseminada. A pneumonia criptocócica é uma infecção primária, enquanto que meningoencefalite é resultante de uma disseminação secundária via hematogênica, considerada a manifestação clínica mais comum da criptococose devido ao tropismo destas leveduras pelo sistema nervoso central, e a doença disseminada é propriamente uma infecção generalizada (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

A meningite criptocócica, a infecção fúngica mais comum do sistema nervoso central (SNC), é considerada a terceira complicação neurológica mais freqüente em pacientes com AIDS em fase avançada (DEL VALLE & PINA-OVIEDO 2006). O agente etiológico, a levedura basidiomicética *C. neoformans*, também infecta com uma menor incidência, indivíduos com

imunidade comprometida, como aqueles em tratamento com drogas imunossupressoras, portadores de sarcoidose ou pacientes com distúrbios linfoproliferativos (DEL VALLE & PINA-OVIEDO 2006).

O complexo de espécies *Cryptococcus* inclui leveduras basidiomicéticas e atualmente é organizado por duas espécies distintas: *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C), e *C. neoformans* separados em duas variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D). Estudos de filogenética molecular demonstraram que os sorotipos do complexo *Cryptococcus* divergiram uns dos outros há milhões de anos. As variedades *grubii* e *neoformans* são separadas por aproximadamente 18 milhões de anos de evolução, e essas variedades diferem de *C. gattii* por aproximadamente 37 milhões de anos (XU *et al.*, 2000) (Figura 1). Mais recentemente, utilizando-se os dados dos genomas de *Cryptococcus* disponíveis, verificou-se que as duas espécies divergiram há 80 milhões de anos (SHARPTON *et al.*, 2008). Diante disso, nosso grupo também se interessou em buscar seqüências de DNA específicas ou polimórficas para *C. neoformans* / *C. gattii* por meio de Análise de Diferença Representacional (RDA genômico). As análises das seqüências identificadas confirmaram a presença de polimorfismos (uma enzima putativa de degradação de insulina - IDE, uma quitina-sintetase e uma proteína do retículo endoplasmático) ou especificidade para *C. gattii* (uma proteína conservada hipotética). Este estudo demonstrou que o conceito atualmente empregado de duas espécies para o complexo *C. neoformans* é válido e confirma os tipos moleculares previamente estabelecidos pelas análises de RFLP, M13 *fingerprinting* e AFLP (FAGANELLO *et al.*, 2009). Foram usados dados de seqüenciamento da região IDE de 73 isolados de diversas regiões do mundo juntamente com os dados de seqüenciamento de outros três loci (*ACT1*, *URA5*, *PLB1*) para estudar as relações filogenéticas entre as espécies. O locus IDE mostrou-se mais conservado entre diferentes tipos moleculares do que os outros loci estudados, e as variações intra-variedades em *C. gattii* são maiores do que em *C. neoformans* (NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2009).

*C. gattii* era uma espécie restrita a regiões de clima tropical e subtropical até o relato, em 2004, de uma epidemia em Vancouver. Mudanças climáticas ou outros distúrbios ambientais podem estar mudando o perfil epidemiológico desta micose (KIDD *et al.*, 2004).

Diferenças na biologia, epidemiologia, patogenicidade, fatores clínicos e suscetibilidade a drogas têm sido relatados e associados com espécies, variedades, tipos molecular e *mating* no Complexo de Espécies *Cryptococcus*.

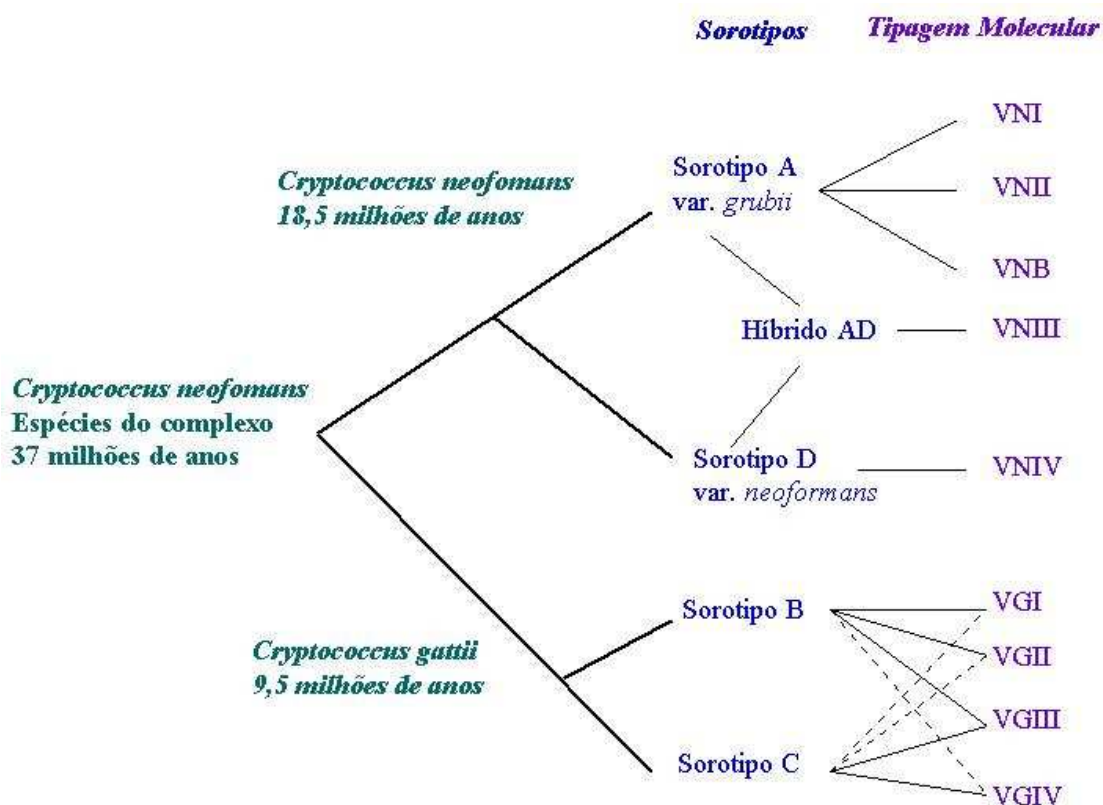
### 1.1.1. *Cryptococcus* e Ambiente hospitalar

Considerando a preocupação mundial com as infecções hospitalares e o risco significativo à saúde dos usuários dos hospitais, sua prevenção e controle envolvem medidas de qualificação da assistência hospitalar, de vigilância sanitária e outras, tomadas no âmbito do Estado, do Município e de cada hospital, atinentes ao seu funcionamento;

O ambiente hospitalar assume condições especiais decorrente de suas atividades, mostrando uma importante relação na disseminação das infecções nosocomiais a partir do próprio ambiente. Segundo o Padrão Referencial Brasileiro Microbiológico de 1998 foi estabelecido um limite máximo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), tanto para fungos e bactérias, adequados para as diferentes áreas hospitalares. Não é permitida a ocorrência de formas micológicas patogênicas ou toxigênicas, julgando-se inadmissível a presença de *Histoplasma capsulatum*, *C. neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis* como patogênicos, e *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Stachybotrys atra* e *Fusarium moniliformi* como toxigênicos.

Hospitais e centros de saúde são tipos de ambiente complexos que requerem ventilação adequada para conforto e controle das emissões que possam ser prejudiciais a pacientes, funcionários e visitantes, bem como um controle ambiental de suas áreas externas, evitando a transferência de contaminação para a área interna. Sabe-se que as causas mais comuns de doença pulmonar intersticial estão relacionadas a exposições ocupacionais e ambientais, especialmente poeiras orgânicas e inorgânicas (SCHWARTZ *et al.*, 1994).





**Figura 1. Evolução do complexo da espécie de *C. neoformans*.** O complexo de espécies de *Cryptococcus* é composto por *C. neoformans* e *C. gattii*, que divergiram de um ancestral comum há mais de 37 e 18,5 milhões de anos, respectivamente. As duas espécies são divididas em 4 sorotipos e 9 tipos moleculares (Adaptada de LIN & HEITMAN, 2006).

### 1.1.2. Nichos ambientais

*C. neoformans* e *C. gattii* são organismos de vida livre que sobrevivem em uma variedade de nichos ambientais como fezes de aves, frutas, vegetais, solo, madeira em decomposição e colméias durante a floração de árvores de eucaliptos (ABEGG *et al.*, 2006; ERGIN, 2004; HORTA *et al.*, 2002; PAL, 1990; PRAKITCHAIWATTANA *et al.*, 2004).

*C. neoformans* é um saprófito ambiental, encontrado em todo mundo, e está associado com solo contaminado de excretas de aves, principalmente de pombas. *C. neoformans* (sorotipo A, D e híbrido AD), provavelmente está presente em solos enriquecidos por excretas

envelhecidas que favorecem condições de amplificação mitótica e *mating* desta levedura (FILION *et al.*, 2006; NIELSEN *et al.*, 2007; STAIB, 1981). As excretas de aves ricas em fonte de nitrogênio, como uréia e creatinina oferecem condições adequadas ao desenvolvimento deste fungo. Além disto, as aves servem como carreadoras, transportando a levedura em suas penas, patas e bicos (LIN, 2009).

*C. gattii* causa infecção predominantemente em indivíduos imunocompetentes, sendo responsável por 70 a 80% dos casos de criptococose em pacientes imunocompetentes, principalmente na Austrália e Papua Nova Guiné (CASADEVALL & PERFECT 1998; LIN & HEITMAN, 2006). O principal nicho ecológico de *C. gattii* são as árvores de eucalipto, particularmente *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus tereticornis*, mas o fungo também tem sido isolado de outras espécies de árvores como *Prunus dulcis*, *Cassia fistula*, *Moliqueia tomentosa*, *Cassia grandis*, *Ficus microcarpa*, *Terminalia catappa*, *Cedrus deodara*, *Cupressus sempervirens*, *Acacia decurrens*, *Acacia visca* e *Pseudotsuga menziessii* (CHAKRABARTI *et al.*, 1997; DIXIT *et al.*, 2009; KIDD *et al.*, 2007; LAZERA *et al.*, 2000; RANDHAWA *et al.*, 2006; REFOJO, 2009). Por razões ainda não determinadas, *C. gattii* adquiriu uma habilidade de colonizar novas regiões bioclimáticas, o que ocasionou um surto de infecção em humanos e animais em Vancouver - Canadá, onde o número de casos de criptococose foi superior aos valores observados em regiões endêmicas da Austrália (SORREL, 2001). A mudança na epidemiologia deste fungo provavelmente é uma consequência de alterações na ecologia e biologia da levedura e ilustra seu potencial em causar doença em humanos e animais (DIXIT *et al.*, 2009).

Além de árvores, outros nichos estão sendo encontrados no ambiente, como descreveu ABEGG e colaboradores (2006), que identificou cinco isolados de *C. gattii* em excretas de aves de cativeiro em um Zoológico do Sul do Brasil.

### 1.1.3. Etiologia e Epidemiologia molecular

Os estudos sobre o gênero *Cryptococcus* se iniciaram no ano de 1894, quando Sanfelice isolou uma levedura a partir de suco de pêssago, e outros autores descreveram isolados clínicos de leveduras encapsuladas que foram consideradas previamente como pertencentes ao Gênero *Saccharomyces*. Em 1901, Vuillemin examinou várias dessas culturas e observou que as características de ascósporos de *Saccharomyces* não estavam presentes, classificando-as então como pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. Em 1970, uma linhagem atípica de *C. neoformans* foi isolada de um paciente leucêmico (VANBREUSEGHEM, 1970). Esse isolado foi classificado inicialmente como uma variedade de *C. neoformans*, *C. neoformans* var. *gattii*, e assim permaneceu até o ano de 2002, quando foi elevado à categoria de espécie por suas diferenças acentuadas com relação às outras variedades, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubbi* (KWON-CHUNG *et al.*, 2002).

As espécies *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubbi* e *C. gattii*, leveduras basidiomicéticas capazes de causar infecção ao homem e animais, estão incluídas no Complexo *Cryptococcus neoformans*. O Complexo apresenta quatro sorotipos de acordo com a natureza antigênica da cápsula polissacarídica, sorotipo A (*C. neoformans* var. *grubbi*) sorotipo D (*C. neoformans* var. *neoformans*), sorotipos B e C (*C. gattii*) e existe ainda um sorotipo híbrido AD (Figura 1).

Estudos epidemiológicos moleculares foram desenvolvidos para genotipar e melhor compreender a epidemiologia de *C. neoformans* e de *C. gattii*. As técnicas utilizadas incluem PCR *fingerprint*, RAPD, AFLP, RFLP e MLST (BOEKHOUT *et al.*, 2001; CASALI *et al.*, 2003; HORTA *et al.*, 2002; KIDD *et al.*, 2004; LITVINTSEVA *et al.*, 2006; MEYER *et al.*, 1999). As espécies e sorotipos do complexo *C. neoformans* são classificados em oito padrões moleculares, como segue: VNI=AFLP1 (sorotipo A), VNII=AFLP1A e AFLP1B (sorotipo A), VNIII=AFLP3 (híbrido AD), VNIV=AFLP2 (sorotipo D) e VGI=AFLP4, VGII=AFLP6, VGIII=AFLP5, VGIV=AFLP7 (todos correspondentes aos sorotipos B e C) (BOVERS *et al.*, 2008).

Recentemente, Ngamskulrungraj e colaboradores (2009) realizaram

uma análise filogenética de isolados haplóides do complexo *Cryptococcus*.e os dados do seqüenciamento multigênico revelaram sete linhagens haplóides, promovendo futuras evidências para considerar os tipos moleculares como variedades individuais, ou até mesmo como espécies.

#### **1.1.4. Diferenciação morfológica e bioquímica de *Cryptococcus***

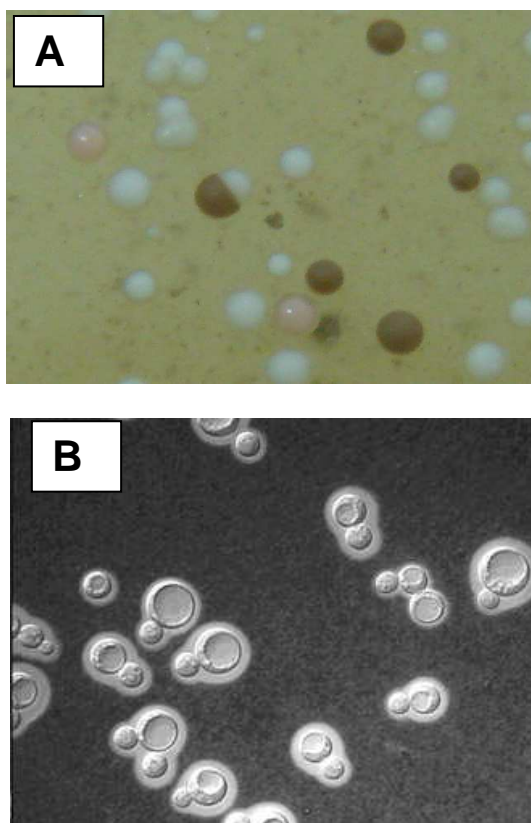
As espécies do Complexo *Cryptococcus*, após cultivo de três dias, com temperatura entre 25° e 37°C, apresentam-se como colônias de margens lisas variando a coloração de branca a creme em cultivo de Agar Sabouraud.

Em meio de cultura com extrato de semente de alpiste (Níger), outra característica importante é a produção de melanina com formação de colônias marrons, não ocorrendo em outras espécies do gênero *Cryptococcus*, nem outras leveduras de interesse médico (CASADEVALL & PERFECT, 1998; WILLIANSO, 1998).

O Complexo *Cryptococcus* é caracterizado por células encapsuladas, leveduriformes, arredondadas ou ovais com diâmetro entre 4 a 6 µm, e se reproduzem por brotamento. A cápsula pode modificar seu tamanho dependendo de fatores genéticos das diferentes linhagens. Cápsulas grandes tendem a se formar durante a infecção, mesmo em linhagens que apresentam cápsula pequena *in vitro*.

Características utilizadas para distinguir o Complexo *Cryptococcus* de outras leveduras incluem a ausência de pseudo-hifas, produção de fenoloxidase, melanina, urease e crescimento em 37°C (Figura 2).

Outra confirmação é a produção da enzima urease, que é responsável pela hidrólise da uréia em amônia, produzida pelo fungo em condições normais de cultivo junto com a visualização microscópica da cápsula polissacarídica por coloração negativa com tinta nanquim.



**Figura 2. Características que permitem diferenciar *Cryptococcus neoformans* de outros fungos.**

**A:** Pigmentação das colônias. As leveduras apresentam colônias marrons em Agar níger devido a produção de melanina. É observada a diferença de colônias de *Cryptococcus* em contraste com as colônias brancas e rosas de outros fungos (este trabalho). **B:** Visualização da cápsula de *Cryptococcus* ([www.bcgsc.ca/project/cryptococcus/summary](http://www.bcgsc.ca/project/cryptococcus/summary)).

As reações em meio de cultivo de CGB (Canavanina – Glicina – Azul de Bromotimol) são usadas para determinar as espécies de *Cryptococcus* (KWON-CHUNG *et al.*, 1982). Apenas a espécie *C. gattii*, é resistente ao aminoácido L-canavanina, utiliza glicina como fonte de carbono liberando amônia, e alterando o pH do meio. Em 2003, foi descrito uma linhagem de *C. neoformans* resistente a L-canavanina, mostrando a necessidade de testes adicionais (KHAN, 2003). Em 2008, Leal e colaboradores propuseram incluir testes moleculares como PCR-multiplex, para evitar resultados errôneos, em sua pesquisa à técnica de

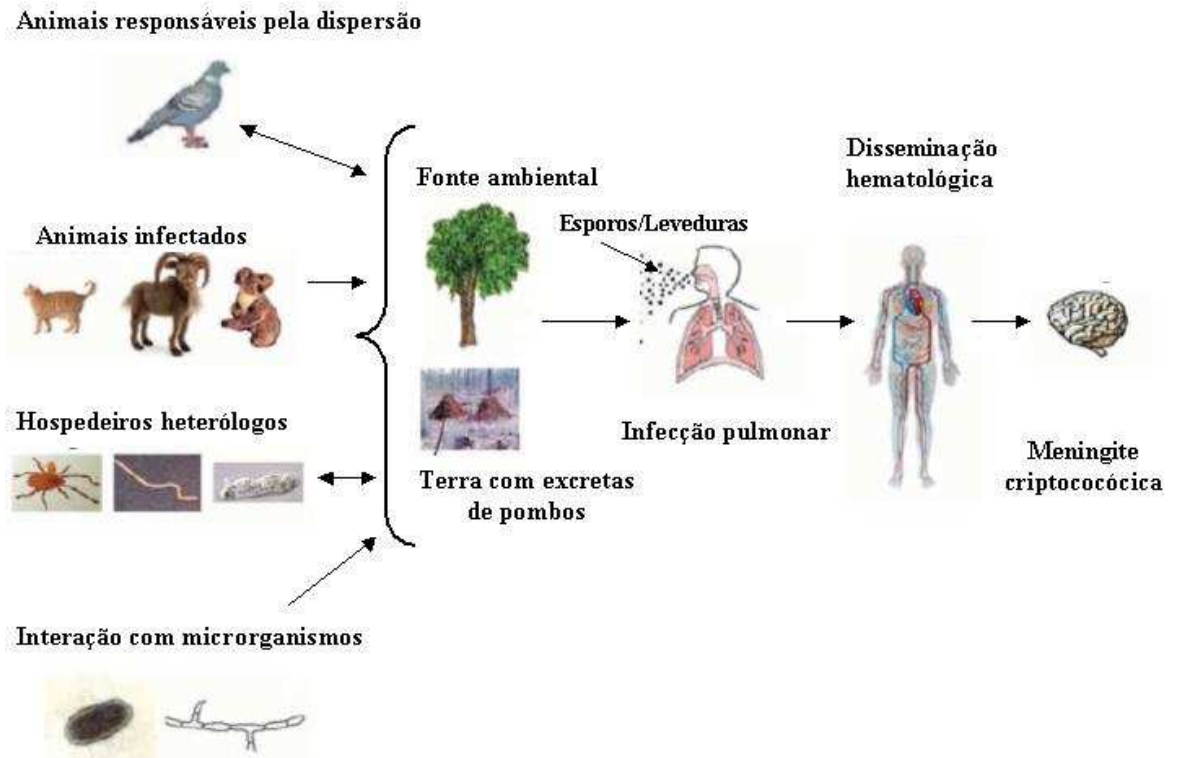
quimiotipagem CGB tipou cinco isolados como falsos positivos e um falso negativo, evidenciando que PCR multiplex é mais confiável e específico que o CGB (LEAL *et al.*, 2008).

### **1.1.5. A infecção por *Cryptococcus spp***

O ciclo de infecção é muito similar entre *C. gattii* e *C. neoformans*. Acredita-se que a infecção seja adquirida por inalação de propágulos do fungo dispersos no ambiente, os quais se alojam nos pulmões e logo podem seguir pela via hematogênica até o sistema nervoso central (Figura 3). As infecções pulmonares são mais brandas. Neste ambiente o fungo pode ser eficientemente fagocitado e destruído pelas células de defesa do sistema imune, ou sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos. Quando atinge o sistema nervoso central, inicia a fase crônica e mais grave da doença, vindo a desenvolver quadros de meningoencefalite ou meningite (LIN & HEITMAN, 2006).

O aspecto clínico da infecção é o mais discrepante entre as espécies *C. gattii* e *C. neoformans*. A doença causada por *C. gattii* é caracterizada por uma alta incidência de criptococomas nos pulmões e cérebro, aumento na morbidade neurológica e resposta mais tardia ao tratamento com antifúngicos (SORREL, 2001). A doença ocasionada por *C. neoformans* é associada a lesões pulmonares e cerebrais que se apresentam como infiltrados mais difusos.

Além da infecção em humanos, também pode ser observada a infecção em animais como gatos, cavalos, cachorros, coalas entre outros, sendo que apresenta ocorrência mais freqüente em gatos que nas outras espécies (CASTELLA *et al.*, 2008). Na epidemia no Canadá, foi relatada uma incidência duas a três vezes maiores de criptococose em casos veterinários que em humanos (LESTER *et al.*, 2004).



**Figura 3: Ciclo de infecção de *Cryptococcus* spp.** O fungo sobrevive no ambiente, no solo e em árvores. Os pássaros, em especial os pombos, podem ser os responsáveis pela distribuição global do fungo. O fungo infecta vários animais: gatos, cachorros, coalas, cabras entre outros. Ele também pode sobreviver no meio ambiente com predadores, assim como aranhas, vermes, amebas e podem ainda estabelecer relação com outros microrganismos, como bactérias e outros fungos. Em humanos, o fungo se estabelece nos pulmões através da inalação de esporos ou células leveduriformes dissecadas, presentes no meio ambiente. Quando o indivíduo torna-se imunocomprometido, o fungo pode reagir da forma latente ou dormente (o qual este pode se encontrar) e invadir o sistema nervoso central (SNC). A infecção do SNC representa a forma mais severa de criptococose humana (Adaptado de LIN & HEITMAN, 2006).

### 1.1.6. Fatores de virulência

*Cryptococcus* spp invade o sistema imune inato através da produção de antioxidantes neutralizando moléculas efetoras do hospedeiro, como a melanina e o manitol (KWON-CHUNG *et al.*, 1986; WONG *et al.*, 1990). Além de outros fatores de virulência, como a fosfolipase que desestabiliza as membranas celulares do hospedeiro (GHANNOUM, 2000) e a urease que altera o pH (COX *et al.*, 2000), *Cryptococcus* spp também apresenta habilidade de sobreviver à temperatura corporal de 37°C (KWON-CHUNG *et al.*, 1992).

Recentemente foi demonstrado que *C. neoformans* é capaz de secretar vesículas contendo muitos destes fatores de virulência, incluindo GXM, lacase, urease e fosfolipase B (RODRIGUES *et al.*, 2008).

A formação de hifas ou pseudohifas por *C. neoformans* em tecidos animais ou humanos tem sido ocasionalmente observada (BEMIS *et al.*, 2000), existindo um baixo potencial de virulência neste tipo morfológico. Altas temperaturas como a temperatura corporal de mamíferos,  $\geq 37^{\circ}\text{C}$ , são supressores do crescimento filamentosos, bem como a alta concentração de  $\text{CO}_2$ , outra característica das condições fisiológicas dos mamíferos que podem suprimir a transição morfológica de levedura para hifa (BAHN *et al.*, 2005). Indicando que o crescimento em altas temperaturas, como  $\geq 37^{\circ}\text{C}$ , é um pré-requisito para *Cryptococcus* spp causar uma infecção sistêmica (LIN, 2009).

Os fatores de virulência de *C. neoformans* em mamíferos são selecionados a partir da sobrevivência no solo. Atributos como a cápsula, melanina e fosfolipase são fatores de virulência de uso que permitem a patogenicidade em animais e a habilidade para sobreviver no ambiente severo do solo (McCLELLAND *et al.*, 2006).

A importância da cápsula como fator de virulência foi demonstrado pela observação de mutantes acapsulares de *C. neoformans* raramente causarem a doença (ALSPAUGH *et al.*, 1998).

A composição da cápsula é de 90-95% de Glicuronoxilomanana (GXM) e 5% de Galactoxilomanana (GalXM) (RAKESH *et al.*, 2008). Esta



estrutura determina o sorotipo do Complexo *Cryptococcus* nos cinco sorotipos distintos. O tamanho da cápsula criptocócica depende das condições ambientais e parece estar fortemente regulada, podendo atingir grandes proporções. Por causa da constituição polissacarídica, na presença de tinta nanquim não é absorvido evidenciando um halo claro que envolve as células (PEDROSO & CANDIDO, 2006). Na natureza, normalmente se apresentam menores enquanto que em isolados clínicos são mais proeminentes (Figura 4). Quando estas partículas são inaladas, para que consiga penetrar em rotas diminutas das vias aéreas, seu tamanho deve ser necessariamente menor que 4µm de diâmetro com pouca ou nenhuma cápsula permitindo a deposição alveolar (CASADEVALL & PERFECT, 1998). No entanto, durante a infecção, ela é aumentada rapidamente e o tamanho depende do órgão afetado. Por exemplo, o pulmão e o cérebro parecem ativar o aumento do tamanho capsular (RIVERA *et al.*, 1998). O tamanho da cápsula foi experimentalmente regulado pelo cultivo de *C. neoformans* em caldo Sabouraud diluído em tampão MOPS pH 7,3, na presença de CO<sub>2</sub> e baixa concentração de ferro (ZARAGOZA & CASADEVALL 2004). Estas condições estão presentes no hospedeiro e podem promover sua produção durante infecção.



**Figura 4. Diferenças no tamanho da cápsula de *Cryptococcus neoformans* em condições naturais e clínica. ZARAGOZA & CASADEVALL, 2004**

## 1.2. ABORDAGEM GERAL DA QUALIDADE DO AR INTERIOR

O conceito de qualidade do ar interno não é recente. No início do século XIV este assunto já era discutido e a solução para este problema era tornar a ventilação adequada em ambientes internos (HAINES & WILSON, 1998). Contudo, os efeitos da poluição do ar interno à saúde humana recebem pouca atenção da comunidade científica.

A partir de 1970 observou-se um aumento no uso de climatização artificial, ocorrendo uma diminuição entre a comunicação do ar interno e externo, ocasionando aumento de concentrações poluentes no ambiente interno.

A Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA) classificou a qualidade do ar interno (IAQ) como um dos mais importantes problemas de saúde ambiental dos anos 90. Problemas relacionados ao IAQ geralmente são causados por duas circunstâncias: ventilação pobre ou inadequada e exposição de uma ou mais fontes contaminantes do prédio (MS HOSPITAL CONSULTING, 2001).

A Organização Mundial da Saúde (WHO 2008) discutiu sobre a qualidade do ar de ambiente interno, e relatou a contaminação microbiológica como causa de absenteísmo no trabalho, considerado o 8º fator de risco mais importante, responsável por 2,7% de doenças no mundo, relacionado a infecções agudas e episódios alérgicos que poderiam ser reduzidos com o controle de contaminantes, classificando a baixa qualidade do ar como Síndrome do Edifício Doente, um problema de saúde pública.

No Brasil foram organizadas normas reguladoras da qualidade do ar, estabelecidas pela Agência Nacional Vigilância Sanitária, como a RE nº 176/2000 e a RE 09/2003, que estabelecem padrões de referência da qualidade do ar interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. Neste mesmo ano, considerando a preocupação com a saúde, segurança, bem estar e conforto de pacientes e trabalhadores de ambientes críticos e semicríticos dos serviços de saúde, foi determinada uma consulta pública referente a Indicadores de Qualidade do Ar Interior em Ambientes de Serviços de Saúde, definido como Norma Técnica,

que abrange parâmetros biológicos, químicos, físicos e possíveis fontes poluentes de natureza biológica, química e física (CP109/2003).

A Norma técnica NBR-7256 - Tratamento de Ar em Estabelecimentos Assistenciais de Saúde (EAS) é compatível com a CP 109/2003, que refere sobre os níveis de risco por exposição ao ar: Nível 1 - risco muito baixo, Nível 2 - fortes evidências de risco (Cirurgia geral, parto cirúrgico, UTI, UTI neonatal) e Nível 3 - fortes evidências de grave risco (pacientes imunossuprimidos, pacientes com graves infecções transmissíveis pelo ar, cirurgia de alto risco e complexidade como cirurgia óssea, cardiológica, neurológica, transplantes e grandes queimados).

Para obtenção de condições satisfatórias do ar ambiental hospitalar, é necessário seguir diretriz como manutenção, operação e controle de sistemas prediais incluindo condições hidrosanitárias e climatização de acordo com características do nível de risco ambiental. Contudo, alguns fatores devem ser considerados críticos para a qualidade do ar, como construções e reformas de qualquer dimensão, presença de aves e suas excretas (NIOSH, 2009).

Ortiz *et al* (2009), afirma em seus estudos que a amostragem de ar executada após a reforma, próximo ao centro cirúrgico, mostrou níveis aumentados de fungos, particularmente espécies do gênero *Aspergillus*. Após a limpeza foram achados níveis fúngicos habituais nos centros cirúrgicos.

As fontes de infecção em ambiente hospitalar veiculada pelo ar estão divididas em fontes internas, das quais são pacientes infectados, portadores assintomáticos, profissionais e visitantes, áreas contaminadas, fontes de aerossóis, ventilação, sistemas de ar condicionado; e fontes externas, como solo e água, que inclui torres de resfriamento e matéria orgânica (CP 109/ 2003).

As variáveis físicas como temperatura, umidade e velocidade do ar, são empregadas em situações de conforto, embora ela também colabore para proliferação biológica.

As características do ar interno dependem diretamente da qualidade do ar no ambiente externo, embora possa ser afetada pelas atividades exercidas dentro das edificações (STATHOLOUPOU *et al.*, 2008), de modo

que o monitoramento de parâmetros biológicos deve ser usado em casos de evidência epidemiológica a eventos específicos em pacientes ou profissionais da saúde.

### **1.2.1. Contaminação fúngica em ambiente hospitalar**

A microflora aerotransportada em ambiente hospitalar é objetivo de numerosos estudos e tem sido apontada como potencial causa de infecção hospitalar (LI, 2003; RAINER, 2001). Alguns evidenciam que várias porcentagens de infecção hospitalar são causadas por fungos, tal como *Candida albicans*, e várias espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* (FAURE *et al.*, 2002).

A infecção fúngica denominada micose pode ser superficial ou cutânea envolvendo a pele. Em oposição, as infecções contraídas por inalação são ditas sistêmicas, pois são disseminadas via linfo-hematogênica, envolvendo um ou mais órgãos (GOLDMAN, 2005).

A maioria dos estudos é executada em unidades de tratamento intensivo, unidade cirúrgica, enfermaria hematológica, maternidade e outras unidades de risco de infecção (LI, 2003; PINI, 2004). Entretanto, poucos estudos correlacionam os níveis de contaminação fúngica ambiental que podem transmitir algum tipo de doença fúngica nos pacientes e corpo funcional. O grau de contaminação por fungos em ambiente hospitalar pode aumentar drasticamente em combinação com vários fatores, como a presença de construções e um micro clima favorável, criado com o uso dos sistemas de climatização artificial que não protegem contra fungos (PERDELLI *et al.*, 2006). Os esporos podem se deslocar a longas distâncias como partículas aerossolizadas e são inaladas pelo homem, podendo depositar-se no sistema respiratório, onde esporos diminutos podem alcançar os alvéolos pulmonares, (CDC, 2006).

A presença quantitativa e qualitativa de agentes biológicos em ambientes fechado é atribuída à umidade e ventilação inadequada (STATHOLOUPOU *et al.*, 2008). O monitoramento do ar em hospitais fornece informações epidemiológicas de doenças nosocomiais infecciosas, investigando e controlando microrganismos aerossolizados dispersos no ambiente interno, (CP 109/ 2003). Fontes de contaminação de

microrganismos aerotransportados estão associadas à redução de ar fresco, que pode ser por isolamento do prédio, insuficiente manutenção e operação dos sistemas de ventilação, regulação da temperatura e umidade relativa desregulada contribui para a presença e multiplicação de bioaerossóis (PEOSH, 2007).

A carga microbiana do ar interno em hospitais é fortemente influenciada pelo número de ocupantes, sua atividade e tipo de ventilação (SAUTOUR *et al*, 2009; PERDELLI *et al*, 2006). Os pacientes são potenciais fontes de microrganismo, e os esporos fúngicos penetram no ambiente interno através dos ductos de ventilação com filtração inadequada. As exposições ambientais e ocupacionais aos agentes inaláveis, podem se associar a uma extensa gama de doenças respiratórias agudas e crônicas, com sério impacto sobre a morbidade e mortalidade por doenças respiratórias (SIMKHOVICH, 2008). De acordo com Quadros *et al* (2008), um maior controle e rigor na manutenção dos sistemas de ventilação desses ambientes e de outros fatores intervenientes na Qualidade do Ar Interno (QAI) diminuiriam os riscos de contaminação do ar o que, por conseqüência, reduz gastos com saúde dos ocupantes e as taxas de absenteísmo. Os sistemas de refrigeração têm sido implicados em surtos de infecções hospitalares através da produção de bioaerossóis, pela veiculação de matéria particulada originada de filtros saturados ou colonizados, pela reduzida taxa de renovação e exaustão de ar (McDONALD *et al*, 1998).

Mesmo não havendo um consenso sobre o papel do ambiente na transmissão de microrganismos patogênicos em áreas hospitalares, a falta de metodologias para análise destas questões ainda é precária. Os laboratórios de microbiologia também são responsáveis pela prevenção e controle das infecções hospitalares, mas dispõem somente de métodos analíticos demorados e pouco sensíveis à identificação e tipagem de microrganismos implicados nos surtos, tornando as informações limitadas em grande parte dos trabalhos realizados.

Assim, a utilização de métodos moleculares de análise rápidos, de alta sensibilidade e especificidade, tem gerado informações que implicam na maior eficácia do controle destas infecções. Os métodos moleculares

aplicados à epidemiologia hospitalar podem ser agrupados conforme sua utilidade, como identificação de agentes infecciosos fundamentado em análise de DNA ou RNA, que permite a identificação de microrganismos de difícil cultivo em pouco tempo.

### **1.2.2. Compostos inorgânicos (CO<sub>2</sub>)**

A concentração média de CO<sub>2</sub> na atmosfera é cerca de 340 ppm (*Federal – Provincial Advisory Committee on Environmental and Occupational Health* - 1989), mas os níveis podem variar dependendo da localização e do tempo. O dióxido de carbono é um metabólico natural, subproduto da respiração humana, cuja concentração em ambiente interno varia entre 700 e 2000 ppm. No Brasil, é recomendado valor máximo de 1000 ppm, definido como indicador de renovação de ar externo, recomendado para conforto e bem estar; entretanto, serve para constatar se a introdução de ar externo no sistema de climatização é suficiente para diluir e dissipar outros poluentes (SUNDELL, 2004).

### **1.2.3. Indicadores da qualidade do ar e eventos adversos**

Os indicadores da qualidade do ar são constituídos por parâmetros qualitativos ou quantitativos e são utilizados como sentinela para determinar a necessidade de medidas corretivas frente a eventos inesperados que possam afetar a saúde de pacientes, trabalhadores ou usuários de serviços de saúde.

As variáveis biológicas são fungos e bactérias viáveis dispersas no ar. Quando monitoradas, servem para controlar possíveis colonizações, multiplicação e disseminação, determinando a qualidade do ar interior. De acordo com a RE 09/2003, os fungos são indicadores biológicos do ar. Nas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas tem aumentado no ambiente hospitalar. Falvey e Streifel (2007) monitoraram fungos do gênero *Aspergillus* em um Hospital Universitário, e afirmam a impossibilidade de manter o ambiente interno livre deste fungo apenas com medidas práticas.

Variáveis físicas como umidade relativa e temperatura são consideradas marcadores de conforto. Entretanto quando a umidade está

alta, possibilita a proliferação fúngica, e a umidade relativa muito baixa causa dificuldades respiratórias diminuindo a produção de muco que serve de filtro de ar para nosso organismo. (RDC 50 /2002 - ANVISA).

O conforto térmico é essencial na cirurgia, pois alivia o estresse térmico do profissional e evita a contaminação por suor. O ambiente térmico pode ser considerado um fator de terapia; surtos de calor e umidade alta prejudicam pacientes cardíacos ou com disfunção do sistema termo regulador.

A baixa umidade relativa do ar causa dificuldades respiratórias porque diminui a produção do muco que serve de filtro de ar para nosso organismo. “A dinâmica respiratória fica bastante prejudicada com o ar seco. Com o muco reduzido, uma bactéria que seria eliminada com facilidade fica ali, aumentando o risco de uma infecção” (Olzon, P. comunicação pessoal).

O indivíduo é contaminado por via aérea quando o agente microbiano é inalado e retido no sistema respiratório, embora fatores como a imunidade, dimensões da partícula, profundidade da penetração e quantidade mínima do agente para causar a doença são fatores ligados a infectividade.

#### **1.2.4. Amostragem do ar**

A amostragem do ar deve ser planejada e alguns aspectos devem ser considerados, como frequência de sintomas respiratórios nos ocupantes, o tipo de ventilação interna, umidade relativa do ar, existência de construções próximas ou no próprio edifício, bem como a técnica a ser usada para a coleta do ar. Outro aspecto a ser observado é a inclusão de uma amostra de ar externo usado como referência.

Existem diversas metodologias para a análise quantitativa de microrganismos no ar, contudo, Lee e colaboradores (2004) afirmaram que não há um consenso entre os especialistas sobre qual metodologia deveria ser considerada como padrão. Felizmente, a maioria dos instrumentos e métodos descritos, usa protocolos padronizados nos manuais de instrução de vários aparelhos utilizados (WILKIE AND MACHER 1999).

As técnicas disponíveis mais utilizadas para a análise microbiológica do ar incluem a sedimentação espontânea e a impactação em meio sólido.

A sedimentação espontânea é feita por exposição de placas de Petri com meios de cultura seletivos, de forma que as partículas dispersas no ar sofram sedimentação pela força da gravidade. Esta técnica é limitada e há um consenso nesta afirmação, pois ela não permite a quantificação dos microrganismos presentes no ar, é dependente da movimentação do ar e do tempo de exposição e não possui sensibilidade para esporos pequenos (Dykstra *et al.*, 1997), os quais não sedimentam prontamente, como é o caso do principal objetivo neste trabalho, o isolamento de *Cryptococcus* spp.

A técnica de impactação em meio sólido, o volume de ar é previamente determinado sendo aspirado, e suas partículas suspensas são lançadas em placas de Petri com meio sólido. Esta técnica permite fazer a quantificação dos organismos viáveis (MORRIS *et al.*, 1999).

Salustiano *et al.*, (2003) usou as técnicas de impactação e sedimentação em placas, e afirma que a impactação recuperou um número mais alto de microrganismos que a sedimentação. Isso explica que as dimensões dos esporos influenciam na deposição da superfície. Sayer *et al* (1969) também estudou as diferenças entre a sedimentação em placas e amostrador de Andersen, um tipo de impactador de ar com múltiplos estágios, verificando que o tamanho dos esporos e a relação numérica encontrando dimensões das partículas em alta, intermediária e baixa aproximadamente 1: 5, 1: 14, 1: 19, respectivamente.

A técnica de impactação em meio sólido é a mais utilizada. O ar é aspirado e lançado com as partículas dispersas diretamente sobre a superfície de meios de cultura em placas de Petri, permitindo gerar resultados quantitativos diretamente pela contagem das UFC resultantes (Morris *et al.*, 1999).

Nesa e colaboradores (2001) compararam o desempenho de vários impactadores de ar para quantificação da contaminação fúngica e afirmaram que este método é mais eficiente que os outros para captação



de esporos fúngicos, e o volume de 100 L parece ser suficiente para avaliação rotineira da qualidade do ar em hospitais.

Falta um consenso na densidade de microflora do ar no qual o risco de infecção possa aumentar. Porém, ao monitorar microrganismos aerossolizados, pode-se avaliar eficiência no controle do ar em unidades equipadas com filtros de alta-eficiência (GANGNEUX *et al.*, 2006)

## **2. JUSTIFICATIVA**

As infecções hospitalares constituem risco significativo à saúde dos usuários dos hospitais. Sua prevenção e controle envolvem medidas de qualificação de assistência hospitalar e vigilância sanitária que podem subsidiar dados científicos de ações de planejamento e correção ambiental relacionadas à presença de pombos, roedores e artrópodes vetores como fonte contaminante no ambiente hospitalar.

Esta pesquisa visa avaliar as condições dos sistemas de climatização e qualidade do ar interior, com o objetivo de prevenir e sanear possíveis riscos e implicações na saúde dos pacientes e corpo funcional e ainda, contribuir com informações através de trabalhos científicos se há presença de microrganismos anemófilos contaminantes, neste ambiente.

O presente estudo tem relevância sócio-sanitária de acordo com a prioridade local, sendo um dos poucos estudos focado em isolados ambientais de *C. neoformans* na área hospitalar.

Assim podemos esclarecer a ecologia, a epidemiologia molecular da espécie na região, e definir um diagnóstico quanto às condições de saúde ambiental deste local, sendo que este é um dos poucos estudos focado na pesquisa de *Cryptococcus* em excretas de pombos associados ao ar interno no ambiente hospitalar.

### **3. OBJETIVOS**

Avaliar a presença de leveduras do complexo *Cryptococcus* por isolamento de amostras ambientais em ambiente hospitalar definindo um diagnóstico quanto as condições de saúde ambiental deste local.

#### **3.1. Objetivos Específicos**

- Isolar amostras ambientais de espécies do complexo *C. neoformans* procedendo a sua identificação e caracterização, utilizando métodos bioquímicos e moleculares.
- Explorar a estrutura genética dos isolados determinando os perfis genotípicos por RFLP-*URA5*, para o conhecimento da epidemiologia molecular destes isolados clínicos e ambientais.
- Determinar os tipos sexuais (*Mating Types*  $\underline{\alpha}$  e  $\underline{a}$ ) por PCR.
- Fornecer dados técnicos – científicos sobre o monitoramento biológico do ar, visando o controle qualitativo e quantitativo em áreas hospitalares.
- Quantificar a microbiota fúngica do ar interno nas unidades tratamento intensivo no âmbito hospitalar
- Avaliar a influência de variáveis ambientais – temperatura, umidade e taxa de dióxido de carbono em ambientes climatizados artificialmente.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Origem dos isolados**

O ambiente amostrado (Figura 5) está localizado na área central de Porto Alegre, onde há na sua proximidade o Parque Farroupilha, proporcionando ainda mais a proliferação de aves do gênero *Columba* (pombos). Foram definidos previamente dez pontos de amostragem na área externa do Hospital para as amostras de excretas, que fazem interface com diversas áreas de internação, e onde estão localizados um dos principais focos de permanência e nidificação de pombos, estando totalmente adaptados neste local. Nestes locais foram coletadas dez amostras de excretas, priorizando locais próximos aos sistemas de climatização onde havia excessivo acúmulo de excretas.

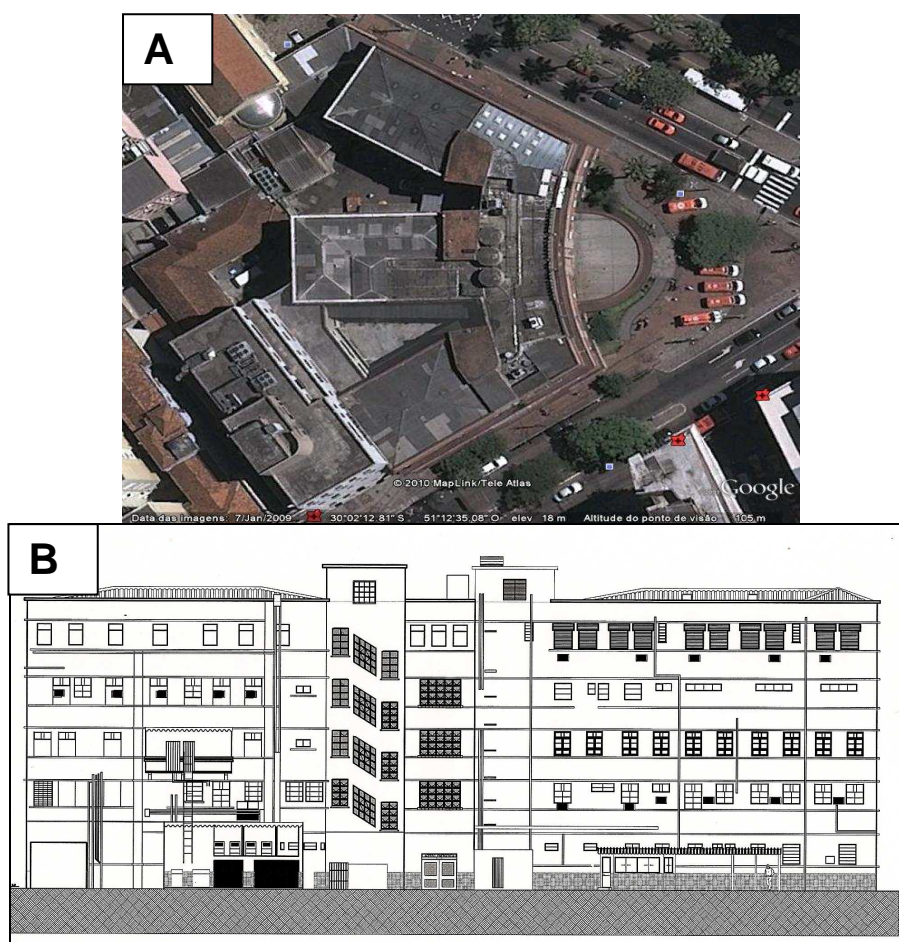
Para a qualidade do ar interno foram feitas quatro coletas de ar, pré-estabelecido nas unidades de internação hospitalar de acordo com seu nível de complexidade, classificado como ambiente crítico e semicríticos, e preferencialmente onde existissem focos excessivos de excretas próximos a ductos de captação de ar ou próximos a casa de máquinas de climatização artificial. As coletas foram realizadas nos meses de fevereiro, março, julho e novembro nas seguintes unidades: área externa (AE), Tomografia (TO), Unidade de traumatologia (UT), Raios-X (RX), Unidade Cardio-clínica (UCC), Unidade de Tratamento Intensivo de Trauma (UTIT), Bloco Cirúrgico (BC), Enfermaria cirúrgica (EC), Unidade de Tratamento Intensivo de Queimados (UTIQ).

### **4.2. Coleta e processamento das amostras**

#### **4.2.1. Excretas de pombos**

Foram coletadas excretas de pombos na área externa do hospital nas estações de inverno e verão, totalizando vinte amostras. Todas as amostras foram coletadas com o auxílio de espátulas estéreis e acondicionadas em potes plásticos estéreis para o transporte ao laboratório.

O processamento das amostras foi realizado segundo o protocolo descrito por Passoni *et al.* (1998) com modificações. Das amostras de excretas de aves foram pesados 0,1g e transferidas para 15 mL de solução salina a 0,9% contendo ampicilina (150 mg/L), tetraciclina (150 mg/L) e cloranfenicol (340 mg/L). Todas as amostras foram colocadas em frascos Erlenmeyers e submetidas à incubação em *shaker* (150rpm) por 60 min a 37°C para permitir a homogeneização. Após esse período foram mantidas sem agitação por 15 min para ocorrer a sedimentação e 3 alíquotas de 100µL do sobrenadante foram coletados para semeadura em 3 placas de Petri contendo Agar Níger (extrato de níger 100g, 1g glicose, 20g de Agar, 1000mL água destilada) acrescido de cloranfenicol (340 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C e examinadas diariamente por 10 dias até o aparecimento de colônias.



**Figura 5. Local amostrado. A.** Visualização aérea; **B.** Fachada lateral interna da Área Amostrada em segmento contínuo.

#### 4.2.2. Ar ambiente

Para a coleta do ar, foi utilizado um amostrador microbiológico por impactação, Sampl'air Lite AES CHEMUNEX (Figura 6), e os parâmetros estabelecidos de acordo com a Legislação Nacional, foi a distância de coleta a 1,5 m do chão e a 1,5 m da parede (RE 09 – Set. / 2003 e CP 109 – Dez / 2003). O método desta amostragem segue com o uso de placas de Petri contendo meio Sabouraud (glicose 20g, peptona 10g, Ágar 18g, extrato de levedura 3g, água destilada 1000 mL) e placas de Petri contendo Ágar Níger (extrato de níger 100g, 1g glicose, 20g de Agar, 1000mL água destilada) ambos suplementados com cloranfenicol (340 µg /mL). Após a coleta as placas foram incubadas a 30° C por três e quinze dias respectivamente, seguidos da contagem de leveduras totais para cultivo em Sabouraud e isolamento de colônias marrons sugestivas para *Cryptococcus* spp para cultivo em Agar Níger. O volume de ar amostrado foi de 0,1 m<sup>3</sup> para cada placa e a amostragem foi executada em triplicata. As medições da concentração de CO<sub>2</sub> foram efetuadas com o aparelho portátil de leitura direta por meio de sensor infravermelho não dispersivo, modelo CO-2 marca Instrutherm (Figura 6). O aparelho segue as recomendações técnicas estabelecidas pela RE 09/2003 - ANVISA, com capacidade de determinar temperatura e umidade relativa do ar com seguintes especificações: Concentração de CO<sub>2</sub>: 0 – 5000 ppm, Temperatura: -20°C a 60°C e Umidade relativa do ar: 10 – 95% .



**Figura 6. Amostrador Microbiológico (A) e Analisador Físico (B).**

### **4.3. Análise microbiológica quantitativa**

#### **4.3.1. Amostras de excretas**

As placas com Agar Níger com desenvolvimento de colônias marrons sugestivas para *C. neoformans* ou *C. gattii*, foram selecionadas para contagem das colônias e quantificação e repicadas para meios específicos para confirmação bioquímica e molecular.

#### **4.3.2. Amostras de ar**

Para as amostras de ar, foram cultivadas em meio Sabouraud após 72h, as colônias crescidas foram quantificadas para determinação de contaminação fúngica; entretanto no cultivo de Agar Níger apenas as colônias sugestivas para *C. neoformans* ou *C. gattii*, foram selecionadas para quantificação e identificação de espécie patogênica.

### **4.4. Caracterização dos isolados**

Na amostragem microbiológica de ar, foi realizada a contagem total de fungos crescidos em meio de Agar sabouraud, e para o *Cryptococcus ssp*, em meio níger, foram observados até o décimo quinto dia de incubação havendo crescimento de colônias marrons, foi considerado positiva para o fungo presente no ar.

Na amostragem de excretas de pombos, toda colônia que apresentaram coloração marrom sugestivas para *C. neoformans* ou *C. gattii*, foi selecionada para caracterização bioquímica e molecular.

#### **4.5.1. Caracterização Bioquímica**

##### **4.5.1.1. Cultivo em Agar níger**

Todos os isolados que apresentaram coloração marrom sugestivas para *C. neoformans* ou *C. gattii*, foram re-inoculados em Agar níger e incubados a 30° C por cinco dias. O desenvolvimento de colônias de coloração marrom era considerado como resultado positivo na produção de melanina.

#### 4.5.1.2. Detecção da Cápsula

Todos os isolados foram testados para presença de cápsula polissacarídica, através da suspensão de uma alíquota do isolado em tinta da china, seguido de observação ao microscópio óptico em 400 X sobre lâmina e lamínula. Nestas soluções, a tinta da china não atravessa a cápsula, evidenciando um halo claro ao redor da célula leveduriforme, confirmando a presença de cápsula polissacarídica.

#### 4.5.1.3. Produção de Urease

A produção de urease foi testada em todos os isolados sugestivas para *C. neoformans* ou *C. gattii*, analisados pelo uso de Uréia agar-base (peptona 1g, glicose 1g, NaCl 5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, uréia 20g, vermelho fenol 0,012g, Agar 18g, água destilada qsq 1000mL, pH 6,8) (CHRISTENSEN, 1946). O meio apresenta cor amarelo palha para urease negativa e cor de rosa choque para urease positiva. A alteração de cor do meio ocorre pela alcalinização do meio pelo produto da hidrólise da uréia, pois esta levedura utiliza uréia pela ação da enzima (COX *et al.*, 2000).

Foi usado como controle negativo amostra de referência de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019)

#### 4.5.1.4. Cultivo em Canavanina-Glicina–Azul de bromotimol

O meio de Canavanina–Glicina–Azul de Bromotimol (CGB) permite identificar diferenças bioquímicas entre *C. neoformans* e *C. gattii*, pois *C. gattii* é resistente a canavanina e utiliza glicina como fonte de carbono ou nitrogênio.

O meio CGB é constituído pela solução A (glicina 10 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> 1g, Tiamina HCl 0,001g, sulfato L-canavanina 0,03g, água destilada qsq 100mL) com ajuste pH 5,6 e esterilizada com filtro de membranas de 0,22 µm. A solução B é composta por azul de bromotimol 0,4 g, NaOH 0,01M 64 ml e água destilada 36 ml. Esta solução deve ser mantida ao abrigo da luz. Para o preparo final do meio foram utilizados 2 mL da solução B, 88mL de água destilada, 2g de ágar e após foi autoclavados. Após a temperatura atingir 50°C foi adicionar 10% da



solução A e homogeneizado, distribuído em tubos com tampa e inclinados (KWON-CHUNG *et al.*, 1982).

Durante a degradação da glicina o meio é alcalinizado e isso altera a cor inicial de amarelo esverdeado para azul cobalto, resultando em positivo. Foi usada como controle positivo a linhagem de *C. gattii* sorotipo B, ATCC 24065 .

## **4.6. Caracterização Molecular**

### **4.6.1. Extração de DNA**

De todos os 238 isolados originados das excretas de pombos foram extraídos o DNA genômico usando o método mecânico com perolas de vidro. Para extração de DNA, foi usado o protocolo descrito por DEL POETA *et al.*, (1999). Foi repicada uma colônia em meio Sabouraud e incubado por 48h a 30°C. Após crescimento foram retirados de 3 a 5 alçadas do isolado e repassados para tubo eppendorf contendo 500 µL de solução de lise (10 mM Tris-HCL pH 7,5; 1mM EDTA pH 8,0; 200mM NaCl; 2% Triton X-100; 1% SDS), 200 µL de pérolas de vidro (Sigma-Aldrich) e 500 µL de fenol-clorofórmio e a suspensão foi agitada em vortex por 15 min. Após a centrifugação por 15 min a 13000 RPM, o sobrenadante foi novamente extraído com 300µL de fenol-clorofórmio (1:1), agitado em vortex por 5 min e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante final foi coletado e os ácidos nucléicos foram precipitados com 1V de etanol absoluto e 200 mM de NaCl por incubação por 1 h a -20° C. Após incubação procedeu-se a centrifugação por 15 min a 13000 RPM o sedimento foi lavado com etanol 70% e seco a temperatura ambiente. Os ácidos nucléicos foram ressuspensos em 30 µL de água milli-Q e tratados com 2µL de RNase A (20µg/mL) por incubação em banho-maria por 30 min a 37°C. A integridade do DNA extraído foi aferida por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com *gel-red* e observado em transiluminador. O DNA foi armazenado em alíquotas a -20°C para posteriores testes.

#### 4.6.2. Determinação de *Mating Type*

Foi determinado o tipo sexual nos isolados de excretas de pombos através do PCR-*Mating Type* onde foram utilizados os seguintes pares de primers  $\alpha 1$  (5'-CTTCACTGCCATCTTCACCA-3') e  $\alpha 2$  (5'-GACACAAAGGGTCATGCCA-3') específicos para mating type  $\alpha$  e  $a 1$  (5'-CGCCTTCACTGCTACCTTCT-3') e  $a 2$  (5'-AACGCAAGAGTAAGTCGGGC-3') específicos para *Mating Type a*, originando respectivamente produtos de amplificação de 101 e 117 pb, respectivamente (CHATURVEDI *et al.*, 2000). As reações de amplificação tiveram volume final de 25  $\mu$ L contendo: 1  $\mu$ L de DNA (20 ng/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de cada *primer* (25 pmol/ $\mu$ L), 200  $\mu$ M de cada desoxirribonucleotideo, 2,5  $\mu$ L de tampão, 1,5mM de  $MgCl_2$ , 0,4  $\mu$ L de Taq-polimerase (CenBiot Enzimas). A amplificação foi executada com aquecimento inicial das amostras a 94°C por 10 min, seguidos de 30 ciclos de a 94°C / 1 min de desnaturação, 60°C / 1min de anelamento, 72°C / 1min de extensão e extensão final a 72°C / 10min realizadas em um termociclador (MiniCycler™, MJ Research).

Os produtos de amplificação foram examinados por eletroforese em gel de agarose 2% corados com "Gel-red" por 2 horas a 100 volts, seguido de visualização sob luz UV. Para controle positivo foi usado amostra de referência ATCC 32045 ( $\alpha$  / a), e controle negativo (sem a adição de DNA).

#### 4.6.3. PCR-Multiplex para determinação de espécies de *Cryptococcus*

A diferenciação molecular das espécies foi realizada utilizando os pares de *primers*: CNa 70S (5'-ATTGCGTCCACCAAGGAGCTC-3'); CNa 70A (5'-ATTGCGTCCATGTTACGTGGC-3') e CNb 49S (5'-ATTGCGTCCAAGGTGTTGTTG-3'); CNb 49A (5'-ATTGCGTGGAACCGTTATC-3'), descritos por Aoki *et al.*, (1999). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 $\mu$ L contendo: 2 $\mu$ L de DNA genômico (50ng/ $\mu$ L); 2,5 $\mu$ L de tampão 10X (10 mM Tris HCl pH 8,3/ 50 mM KCl/ 1,5 mM  $MgCl_2$ ); 1,15 $\mu$ L de  $MgCl_2$  (50mM); 2,5 $\mu$ L de dNTP (1mM); 0,5 $\mu$ L de cada *primer* (CNa 70A/ CNa 70S/ CNb 49A/ CNb 49S) e 0,5 $\mu$ L de Taq-polimerase (5U/ $\mu$ L - CenBiot Enzimas).

Todas as reações foram realizadas em um termociclador (MiniCycler™, MJ Research), por um aquecimento inicial a 94°C/10 min e 35 ciclos compreendendo 94°C/1 min de desnaturação, 65°C/1 min de anelamento, 72°C/2 min de extensão. Após os ciclos, foi realizada uma extensão final a 72°C/10 min (LEAL *et al.*, 2008). Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 1% corado com *Gel-red*, após migração por 1 h a 100 volts. Foram utilizados controles negativos (reações completas sem adição de DNA genômico) e controles positivos (reações completas com DNA de diferentes linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*. Os padrões positivos utilizados foram fornecidos por Wieland Meyer (Center for Infections Disease and Microbiology, Molecular Micology Laboratory, The University of Sydney, Departamento of Medicine at Westmead Hospital, Westmead, Austrália): WM148 (VNI), WM626 (VNII), WM628 (VNIII), WM629 (VNIV), WM179 (VGI), WM178 (VGII), WM161 (VGIII), WM 779 (VGIV).

#### 4.6.4. Determinação de Genótipos por *URA5*-RFLP

Para verificação dos tipos moleculares dos isolados, foi aplicado a técnica de *URA5* – RFLP com dupla digestão (MEYER *et al.* 2003). Esta técnica agrupa os isolados em oito tipos moleculares previamente estabelecidos. PCR de *URA5* foi conduzido com volume final de 25µL. Cada reação contém 50ng de DNA; 1 X de tampão ( 10mM Tris pH8,3, 50mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 1,5 U Taq DNA polimerase (Cenbiot Enzimas); e 50 ng de cada primer *URA5* (5'ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG3') e SJ01 (5'TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC3'). O PCR foi executado por 35 ciclos a 94°C por 1 min de desnaturação, 1 min de anelamento a 65°C, 2 min de extensão a 72°C seguidos por 10 min de extensão final a 72°C. Produtos de amplificação foram associados com enzimas de restrição da seguinte forma: 1X de tampão, 1µL de BSA e 15 µL de produto de PCR tiveram dupla digestão com *Sau 96I* (5U / µL) e *HhaI* (20U / µL) por 4h a 37°C e 15 min por 65°C para inativação das enzimas. Esta dupla digestão foi separada por eletroforese em gel de agarose 3% a 100V por

5h. O padrão de RFLP foi determinado visualmente comparando com os padrões fornecidos por Wieland Meyer, VNI-VNIV e VGI-VGIV.

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1. Amostragem das excretas de pombos

De 60 amostras de excretas de pombos analisadas, 20 (33,3%) foram positivas para o fungo *C. neoformans*. Nas duas estações do ano, ou seja, inverno e verão, em que o fungo foi isolado, foram observados crescimento nos mesmos pontos de coleta dos setores de Tomografia, Traumatologia, Radiologia e Unidade Córdio-Clínica 1 (Tabela 1). A presença da levedura comprova que em locais onde há acúmulo excessivo de excretas, torna-se possível a reprodução de resultados, enquanto a ausência de isolados em outros pontos pode demonstrar a necessidade de uma maior amostragem ou monitorização mais freqüente.

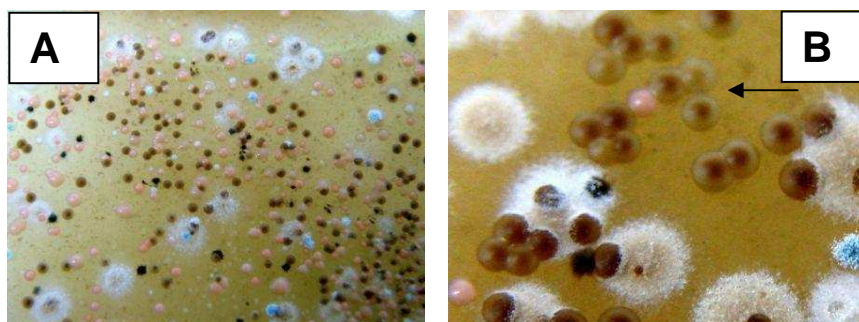
Na primeira amostragem, no inverno, todas as colônias de *Cryptococcus* foram selecionadas (68). Na segunda amostragem, no verão, houve um crescimento significativo de 1947 colônias presuntivas de *Cryptococcus*; entretanto, somente 170 foram selecionadas por apresentarem em alguns isolados, diferenças morfológicas (Figura 7). A justificativa para este aumento no número de isolados pode ser atribuída a elevadas temperaturas próprias da estação.

**Tabela 1.** Número de colônias presuntivas de *Cryptococcus* spp isoladas de excretas de pombos no inverno e no verão.

	Número de CFU / grama de Excreta					
	1ª coleta: inverno			2ª coleta: verão		
	1ª amostra	2ª amostra	3ª amostra	1ª amostra	2ª amostra	3ª amostra
Tomografia	0	1	0	280	150	168
Traumatologia	0	3	6	4	7	1
Radiologia 1	17	8	30	275	196	168
Radiologia 2	0	0	0	0	0	0
Cardio-clínica 1	1	2	0	240	190	268
Cardio-clínica 2	0	0	0	0	0	0
Enf. Cirúrgica 1	0	0	0	0	0	0
Enf. Cirúrgica 2	0	0	0	0	0	0
UTI-TR	0	0	0	0	0	0
Queimados	0	0	0	0	0	0

CFU: Unidades formadoras de colônias.

O papel dos pombos como portadores deste fungo patogênico, mostra o estabelecimento entre a relação de *Cryptococcus* e suas excretas atualmente consolidadas. Alguns autores afirmam que números elevados de isolados dependem de vários fatores ambientais, incluindo quantidade de material, temperatura, umidade e luz solar direta (BARONI *et al.*, 2006; PASSONI *et al.*, 1998; PEDROSO AND CANDIDO 2006).



**Figura 7. Colônias isoladas presuntivas de *Cryptococcus spp* (colônias marrons) e de outros fungos. (A)** Na cultura primária de excretas, observa-se inúmeros isolados de *Cryptococcus spp.* encontrado na terceira amostra da Unidade Cardio-Clínica; em **(B)** observa-se a melanização ocorrendo do centro para extremidade, colônias marrons com aspecto levemente mucóide.

As excretas de pombos são consideradas substratos significativos para *C. neoformans*, e a adaptação destas aves nos centros urbanos constitui uma fonte ambiental importante de risco para a saúde pública.

A criação da pomba doméstica (*Columba livia*) é proibida na zona urbana de Porto Alegre e alimentá-la é contravenção ([www.portoalegre.rs.gov.br/sms](http://www.portoalegre.rs.gov.br/sms)).

Sem inimigos naturais nas metrópoles, esta ave prolifera rápido. Biologicamente, sua postura por geração é de um a dois ovos, e está diretamente relacionada com a disponibilidade de alimento.

A sua reprodução depende de fatores ambientais como a duração do dia e a elevação da temperatura. Pela simpatia que desperta, é alimentada diariamente por muitas pessoas e a arquitetura urbana disponibiliza uma variedade de abrigo.

Um dos principais objetivos da Vigilância Ambiental é a identificação dos riscos e divulgação das informações referentes aos fatores ambientais condicionantes e determinantes nas doenças e agravos à saúde.

Na instituição estudada, foi observado acúmulo excessivo de excretas depositadas nos beirais, telhado e aparelhos de ar condicionado, o que permitiu concluir a permanência de pombos neste local por vários anos (Figura 8), sua arquitetura proporciona espaços adequados para pouso, abrigo e nidificação. Os equipamentos de climatização artificial constituem o conforto térmico das unidades de internação mais importantes do hospital e estão muito próximos a esta fonte contaminante.



**Figura 8. Fonte orgânica de contaminação ambiental. A:** Concentração excessiva de excretas de pombas na área hospitalar externa; em **B** a nidificação desenvolvida em ninhos confeccionados com as próprias excretas.

Em 1959, LITTMAN descreveu um caso de estudante de medicina que desenvolveu meningite criptocócica possivelmente resultado de exposição ao ar condicionado fortemente contaminado com excretas de pombas.

Na literatura existem inúmeros estudos relacionando isolamento de espécies do Complexo *Cryptococcus* com excretas de pombos, confirmando nossos resultados e reforçando evidências que este é um dos principais reservatórios para esta levedura patogênica (RUIZ & BULMER, 1981; HORTA *et al*, 2002; BARONI, 2006; KIDD, 2007; BOYTON *et al* 2007; BALTAZAR, 2008). COSTA *et al.*, 2009 pesquisou 47 amostras de excretas de pombos isolando *C. neoformans* em 10; entretanto, a levedura

não foi recuperada em nenhuma dos 322 *swabs* de cloaca de pombos. No Rio Grande do Sul, em 31,3% de excretas de pombos e 94,4% das amostras de liquor de pacientes com AIDS foram isolados *C. neoformans* (HORTA *et al.*, 2002), NISHIKAWA *et al.*, 2003, isolaram *C. neoformans* não somente de excretas de pombos e aves urbanas, mas também de madeira. Nas 44 amostras de madeira foram isolados 25 sorotipo A e 18 sorotipo B, sugerindo outras fontes importantes para a infecção. Estudos com aves de cativeiro também relacionaram a presença de *C. neoformans* nas excretas, CAICEDO *et al.*, 1999 coletaram 110 amostras de excretas de aves em Zoológico na Colômbia conseguindo apenas 1 isolado da levedura, enquanto ABEGG *et al.*, 2006 das 55 gaiolas estudadas em Zoológico no Sul do Brasil, 10 foram positivas.

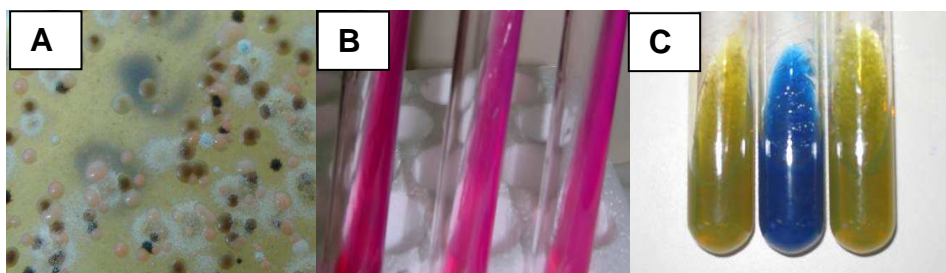
As fontes de *Cryptococcus* são altamente variadas e estão relacionadas com substratos orgânicos (KWON-CHUNG & BENNETT, 1978). A frequência no isolamento de *C. neoformans* é maior nas excretas secas (GRANADOS AND CASTANEDA 2005); entretanto, recentes estudos mostram que o fungo também pode ser isolado de excretas frescas de animais confinados (LUGARINI *et al.*, 2008).

Desta forma, a literatura científica sedimenta ainda mais a frequência de *C. neoformans* em excretas de pombos, necessitando atenção das autoridades de saúde e da população em geral para prevenção da criptococose.



## 5.2. Caracterização bioquímica

Os 238 isolados das excretas de pombos foram examinados microscopicamente com tinta da china para identificação da cápsula polissacarídica, e todos apresentavam cápsula; entretanto, na maioria das vezes diminutas. Os isolados selecionados foram cultivados em Agar níger e produziram melanina e a atividade de urease também foi positiva em todos eles concordando com estudos anteriores (Figura 9).



**Figura 9. Caracterização Bioquímica.** A: melanização (colônias marrons); B: urease positiva, e C: quimiotipagem por CGB representados por azul cobalto como reação positiva e amarelo como reação negativa.

A presença da cápsula polissacarídica no ambiente tem função primária, e pode ser facilmente observada sob microscópio óptico; a estrutura está relacionada com a sobrevivência da levedura no ambiente, é fator de proteção contra a dessecação e predação por amebas (BUNTING *et al.*, 1979). No organismo dos mamíferos, a cápsula geralmente se apresenta aumentada devido a vários fatores, como a limitação de ferro e CO<sub>2</sub> dissolvido nas células (VARTIVARIAN *et al.*, 1993). Tal estrutura atua como antifagocítica tornando-se pouco imunogênica. Em nossos achados, o tamanho da cápsula se comporta de maneira tradicional para isolados ambientais, sustentando resultados compatíveis com outros autores de que em condições *in vivo* a espessura é freqüentemente de 1 - 2µm (RIVERA *et al.*, 1998; LITTMAN, 1958).

A habilidade de pigmentação de *Cryptococcus* foi primeiro descrita por STAIB (1960) quando notou colônias marrons em meio com semente de pássaro. Esta propriedade tem sido explorada na identificação da

levedura por laboratórios de microbiologia (STAIB *et al.*, 1987). A melanina atua na proteção de raios ultravioleta, tem habilidade na termo-tolerância, protege contra metais pesados. *Cryptococcus* spp. estão presentes em excretas de pombos e parecem estar melanizados, permitindo a sobrevivência no ambiente (NOSANCHUK *et al.*, 1999; ROSAS AND CASADEVALL 1997; WANG AND CASADEVALL 1994). Assim a melanização em *C. neoformans* fornece um excelente modelo de estudo no mecanismo pelo qual microrganismos promovem virulência (CASADEVALL *et al.*, 2000).

A urease é a enzima responsável pela hidrólise da uréia em amônia e carbamato, e o fungo *Cryptococcus* produz esta enzima em grandes quantidades. Assim, para investigar sua patogenicidade, foram infectados camundongos com mutantes de *Cryptococcus* Urease negativa, que apresentaram mais sobrevivência do que camundongos infectados com cepas controle urease positivo (COX *et al.*, 2000), o que sugere seu papel na virulência por meio de análises espectrofotométricas. Estudos mais recentes demonstraram que *C. neoformans* produz mais urease do que *C. gattii* (TORRES-RODRIGUES *et al.*, 2008). Em nossos estudos, houve atividade de urease em todas as amostras positivas para o fungo, entretanto não foi quantificada a produção em nossos isolados.

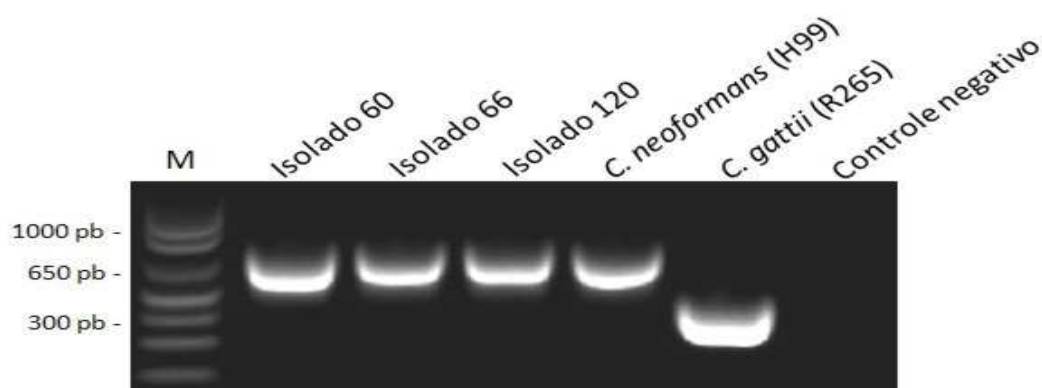
Para identificação das espécies de *Cryptococcus* foi aplicado o teste canavanina-glicina azul de bromotimol (CGB), onde a troca de coloração do amarelo para azul cobalto é indicativa de *C. gattii* gerando resultado positivo para a técnica. KWON-CHUNG *et al.*, 1982 verificou que *C. gattii* usava glicina como fonte de carbono e nitrogênio, resistindo a L-canavanina; a amônia liberada na clivagem da glicina é a responsável pela troca de cor. Todos os 238 isolados foram testados resultando em 98,3% *C. neoformans* e 1,7% *C. gattii*, destes novamente foram repetidos o teste de CGB confirmando o resultado. A execução do teste CGB até o resultado final leva em torno de 7 dias, que para o diagnóstico clínico é longo. Contudo, é um método tradicional, econômico e de fácil aplicação para diferenciar *C. neoformans* de *C. gattii* e, desde sua introdução, tem sido usado em muitos laboratórios. Entretanto alguns autores sugerem que

apenas a reação positiva de CGB não é suficientemente confiável para distinguir as duas espécies, (KLEIN *et al.*, 2009).

### 5.3. PCR-Multiplex para determinação de espécies

Havendo a necessidade de outros métodos para obtenção de uma confiável identificação de espécies, LEAL *et al.*, (2008) desenvolveram a técnica de PCR Multiplex que apresentou 100% de especificidade e sensibilidade em seu estudo. Foram analisados 131 isolados previamente subcultivados pelo CGB como *C. neoformans* (121) e *C.gattii* (10), e quando aplicada esta ferramenta molecular obtiveram 125 *C. neoformans* e 6 *C gattii*. Em outro estudo, 101 leveduras foram classificadas pela produção de urease, produção de melanina, assimilação de glicina pelo CGB e seqüenciamento D2. 17/17 foram *C. gattii* e 54/54 *C. neoformans* e várias outras leveduras positivaram o CGB, indicando que somente ele não pode ser usado para identificação de *C. gattii*. Estes fatos demonstram que associado a outras técnicas bioquímicas e pelo menos uma molecular pode ser usado para distinguir as duas espécies (KLEIN *et al.*, 2009).

Para a confirmação dos resultados bioquímicos, usamos o teste para diferenciação das espécies por PCR Multiplex, no qual os quatro isolados *C. gattii* anteriormente identificados pelo meio CGB, na técnica molecular confirmou ser *C. neoformans* (Figura 10) com amplificação de um *amplicom* de 695 pb correspondente ao controle positivo da espécie. Com esses resultados evidenciou-se a necessidade de incluir testes moleculares para a correta identificação destas espécies.



**Figura 10. Espécies de *Cryptococcus* identificadas por PCR-Multiplex.** Eletroforese em gel de agarose com produtos amplificados usando pares de *primer* CNA70A-CNA70S e CNB49A-CNB49S.

#### 5.4. Determinação de Genótipos por *URA5*-RFLP

No Brasil, foi realizada uma pesquisa para analisar o tipo molecular de 443 isolados de *Cryptococcus* para determinar sua distribuição geográfica, representados pelas regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste (NISHIKAWA *et al.*, 2003). O tipo molecular mais comum no Brasil foi VNI (64%), seguido de VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3% cada) e VNIII (<1%). A tendência epidemiológica na região Norte é predominantemente *C. gattii* enquanto que na região Sul é *C. neoformans* (TRILLES *et al.*, 2008). Diferenças climáticas podem ser consideradas a resposta à grande diversidade de isolados das diferentes zonas geográficas do Brasil, mas o mecanismo pela qual esta diversidade é gerada ainda é desconhecido.

A distribuição de sorotipos pela região geográfica brasileira foi comprovada através da pesquisa de 467 isolados, no qual houve prevalência do sorotipo A em isolados clínicos e ambientais, no Sul e Sudeste, enquanto que o sorotipo B, predomina nas regiões Norte e Nordeste, NISHIKAWA *et al.*, (2003).

*C. neoformans* é o principal agente etiológico da criptococose em todo mundo. No Brasil, mais de 70% dos pacientes com AIDS moram nas

regiões sul e sudeste, onde ocorre evidente ação antrópica e desmatamento nas grandes cidades. Entre os casos acumulados de 1980 até junho de 2009, a Região Sudeste concentra o maior percentual (59,3%), com 323.069 registros da AIDS. O Sul registra 19,2% dos casos, com 104.671 notificações; o Nordeste tem 11,9%, com 64.706; o Centro-Oeste 5,7%, com 31.011; e o Norte 3,9%, com 21.389 (<http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2009/11/26>)

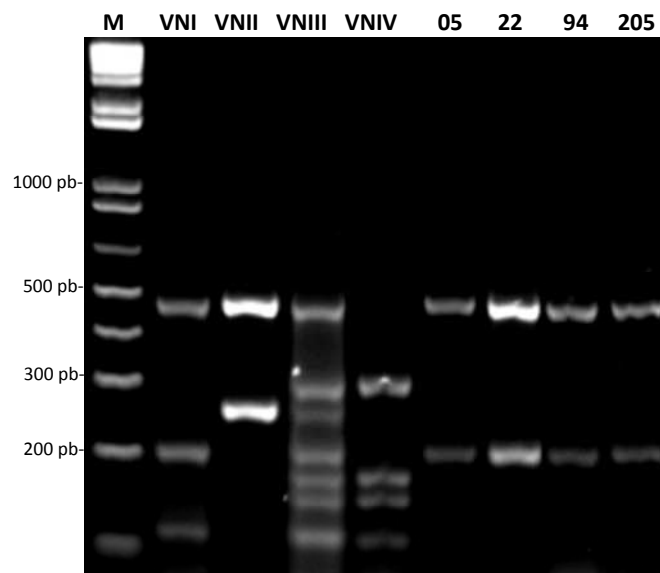
Recentes estudos de tipagem molecular no Brasil têm evidenciado a presença de VNI e VNII em amostras clínicas, e VNI, VNIV e VGI em amostras ambientais principalmente na região sul e sudeste (NISHIKAWA *et al.*, 2003).

Técnicas moleculares como RFLP são ferramentas consideradas de excelência para analisar diretamente o genoma e estudos epidemiológicos de muitos patógenos. Esta técnica é usada para distinguir mudanças genéticas dentro de uma espécie, onde o DNA genômico é fragmentado por enzimas de restrição e cada um destes cortes corresponde a bases curtas de DNA gerando fragmentos de vários tamanhos (SAMBROOK *et al.*, 1989).

FRASÉS e colaboradores (2009) analisaram 97 isolados da levedura *C. neoformans* a partir de amostras ambientais, veterinárias e clínicas. Para explorar o conhecimento epidemiológico e a diversidade genética usou gene *URA5-RFLP*, mostrando resultados elevados para o tipo VNI (33%). Os isolados obtidos nesta pesquisa, foram genotipados pela análise do gene *URA5-RFLP*, com dupla digestão usando enzimas de restrição *Sau96* e *HhaI*. O resultado do perfil de restrição foi comparado com o padrão de bandas das cepas de referência. A maior prevalência foi do genótipo VNI sorotipo A, *var. grubii* (Figura 11), o que consiste o predomínio de *C. neoformans var grubii* em fontes ambientais, confirmando heterogeneidade da distribuição de VNI.

Estes resultados em amostras ambientais reforçam os achados clínicos em pacientes imunodeprimidos, onde as maiorias dos isolados são representados pelo tipo molecular VNI.

Isolados clínicos e ambientais de países Ibero-Americanos apresentaram predomínio no tipo molecular VNI sorotipo A (92,6%), o que corrobora com resultados recentes, ser o genótipo mais comum em todo o mundo (MEYER, 2003).



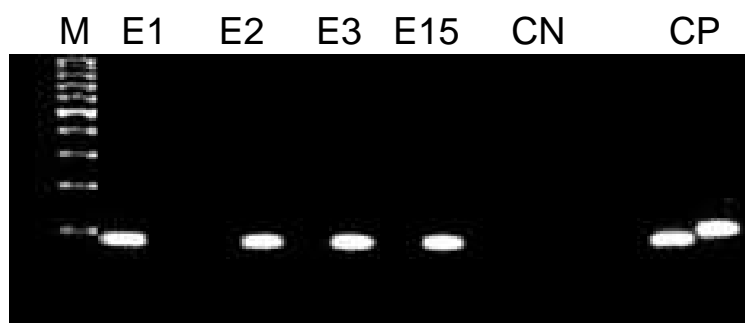
**Fig. 11: URA-5 RFLP.** M: marcador de tamanho molecular 1Kbplus DNA ladder (Invitrogen) indicado em pares de base (pb); VNI, VNII, VNIII e VNIV: padrões moleculares referentes a *Cryptococcus neoformans*; Amostras 05, 22, 94, 205: isolados de *C. neoformans* do ambiente externo hospitalar.

### 5.5. Determinação de *Mating Type*

Inúmeros estudos confirmam a maior virulência que células *Mat α* exibem comparadas a virulência das *Mat a*, predominando em amostras ambientais e clínicas em todo mundo (BARCHIESI *et al.*, 2005; KELLER *et al.*, 2003). Na Colômbia, existe uma prevalência de *Mat a*, nos isolados de *C. gattii* sorotipo B; entretanto esse resultado não foi observado em nenhuma outra região do mundo (ESCADÓN *et al.*, 2006). ○ recente surto de criptococose em Vancouver – Canadá reportou que todos os casos isolados, o agente causador foi VGII *Mat α* (KIDD *et al.*, 2004). A caracterização molecular de *Mating type* também pode ser executada por

um PCR multiplex com amplificação simultânea, associando o sorotipo usando *primers* específicos, uma alternativa aceitável para redução de custos em cada reação (CARVALHO *et al.*, 2007).

Foi usado a cepa ATCC 32045 ambos *Mat α* e *Mat a* (Figura 12) como controle positivo, com produtos de amplificação de 101 e 117 pb respectivamente, e todos os isolados testados neste trabalho são *Mating Type α*. A determinação de *Mating type* dos 238 isolados ambientais mostra que a análise está de acordo com relatos feitos por KWON-CHUNG e BENNETT, 1978, que isolados *MAT α* são mais prevalentes que *Mat a* entre amostras clínicas e ambientais, indicando ser mais virulento em modelos animais (KWON-CHUNG & BENNETT 1978; CASALI *et al.*, 2003).



**Figura 12. Amplificação de PCR para determinação do *mating type*.** Isolados ambientais. Marcador, Excreta E1, E2, E3 e E15. CN: controle negativo, CP: controle positivo  $\alpha$  e *a* com 101 e 117pb.

## 5.6. Amostragem do ar interno

A exposição humana a *Cryptococcus* é comum, ocorrendo freqüentemente em locais onde haja presença de pombos como jardins zoológicos, *pet shops*, torres de igrejas, torres comerciais, residências, praças entre outros (ABEGG *et al.*, 2006; BARONI *et al.*, 2006; CAICEDO *et al.*, 1999; LUGARINI *et al.*, 2008; PASSONI *et al.*, 1998; REOLON *et al.*, 2004; RUIZ e BULMER 1981; SOARES *et al.*, 2005). Desta forma, houve a necessidade de se pesquisar a presença deste microrganismo em fontes

externas e internas por se tratar de ambiente de assistência à saúde tendo constantemente a presença destas aves.

A nossa compreensão de Síndrome do Edifício Doente, é um problema complexo e exhibe certa dificuldade pela falta de padronização de protocolos na avaliação de fungos de interior. Devido à falta de normas, é difícil de comparar os resultados de diferentes estudos ou medir o efeito da contaminação fúngica no interior de um edifício e seus ocupantes. Entretanto, de acordo com a legislação atual, não devem ser aceitos nos ambientes, microrganismos potencialmente agressores com transmissão comprovada por via ambiental, excetuando-se as áreas de isolamento destinadas à internação de pacientes com infecção transmitida pelo ar (CDC 2001). De acordo com a literatura mundial, *Cryptococcus* é transmitido por rota ambiental, e como foi recuperado de fontes orgânicas na área externa da Instituição fez-se necessária à busca no ambiente interno através de coletas de ar.

Infecções por *C. neoformans* podem ocorrer em ambientes de cuidados médicos se o solo estiver contaminado por excretas de pombas e houver inadequado funcionamento dos sistemas de ventilação (CDC, 2003). Sendo assim, foram coletadas 108 amostras de ar entre fevereiro de 2008 e junho de 2009 para o isolamento de *Cryptococcus*, pela técnica de impactação de ar. Mesmo estando em desacordo sanitário, não foi recuperado nenhum propágulo aerossolizado de *C. neoformans* nas áreas internas da Instituição. Em nossos estudos a ausência de isolados no ar pode estar relacionada com o baixo número de amostragens, embora poucos autores notifiquem o total número de amostragens, pois relatam somente o número de amostras positivas (RUIZ & BULMER, (1981); CAICEDO *et al.*, (1999); SALUSTIANO *et al.* (2003); SOARES *et al.*, (2005); ABEGG *et al.*, (2006)). Na literatura mundial a levedura *C. neoformans* está evidenciada como um patógeno que tem origem ambiental transmitido por via aérea justificando nosso interesse.

Em 1981, RUIZ & BULMER isolaram em média  $5,9 \times 10^5$  a  $9,9 \times 10^5$  células de *Cryptococcus* em excretas de pombas e 45 células / 100L de ar, em um prédio na cidade de Oklahoma, usando Amostrador de Andersen para quantificar e classificar o tamanho das partículas aerossolizadas de



*Cryptococcus*. Poucas pesquisas comparam a inter-relação do isolamento da levedura em excretas de pombos e amostras de ar no Brasil, e os que fizeram usaram a técnica de exposição de placas.

As partículas de bio-aerossóis de maneira geral têm tamanho entre 0,3 e 100µm de diâmetro; no entanto a fração de partículas respiráveis primariamente preocupantes são de 1 a 10 µm. Os microrganismos aerotransportados que apresentam tamanho de 1 a 5 µm geralmente permanecem no ar, enquanto que partículas maiores são depositadas nas superfícies (MOHR, 2002). Com base nessas informações, a probabilidade de isolamento de *Cryptococcus* spp com um amostrador microbiológico por impactação é maior, pois está classificado como uma levedura de tamanho diminuto entre 2-8µm. Conforme SALUSTIANO *et al.*, (2003), a técnica por impactação de ar comparada à técnica de sedimentação obteve melhores resultados quanto ao número de microrganismos recuperados.

A menor sensibilidade da cultura por sedimentação, é explicada pela necessidade da deposição de partículas viáveis na superfície, que depende do diâmetro do microrganismo. Nos nossos estudos, nas amostragens de ar foi usada à técnica de impactação, embora não tenha sido recuperado nenhum isolado de *Cryptococcus*.

CAICEDO *et al.*, (1999) expôs 270 placas e 110 coletas de excretas de aves do zoológico da Colômbia, e conseguiu recuperar apenas uma amostra de cada fonte ambiental, argumentando que estes resultados são produtos de adequada limpeza e desinfecção das gaiolas do Zoológico. Em 2005, foram pesquisadas as excretas de 59 espécies de aves em 55 gaiolas de um Zoológico no Sul do Brasil, havendo positividade para *C. grubii* e *C.gattii* em 10 amostras e ausência do fungo em exposição de placas (nº não informado, ABEGG *et al.*, 2006). SOARES *et al.*, (2005) isolaram *C. neoformans var grubii* (13,9%) de amostras de excretas de pombos, no entanto na exposição de placas não recuperaram nenhuma colônia de *Cryptococcus*. BARONI *et al.*, (2006) foram os primeiros a relatarem o isolamento do fungo em torres de igreja no Rio de Janeiro; 304 placas de ar foram expostas e em quinze delas foram recuperados *Cryptococcus*. Entretanto, a contagem foi menor de 50UFC e a baixa taxa de colônias depende de vários fatores tal como a direção dos ventos.

PEDROSO e CANDIDO, 2006 e PEDROSO *et al.*, 2007 recuperaram a levedura em dois locais dos 32 amostrados, explicando que as razões pela baixa freqüência ou ausência de isolamento no ar se devem pelo baixo número de árvores e pelo pouco volume de excretas de pombos nestas áreas.

No Canadá foram caracterizadas fontes ambientais com potenciais determinantes de colonização de *C. gattii*, isolado de árvores, solo, ar, rios e mar foi observada a sazonalidade e foi verificada uma concentração elevada de propágulos infecciosos (<3,3µm) em amostras de ar durante os meses de verão quente e seco nos ecossistemas terrestres CDF (Coastal Douglas Fir) na British Columbia (KIDD *et al.*, 2007).

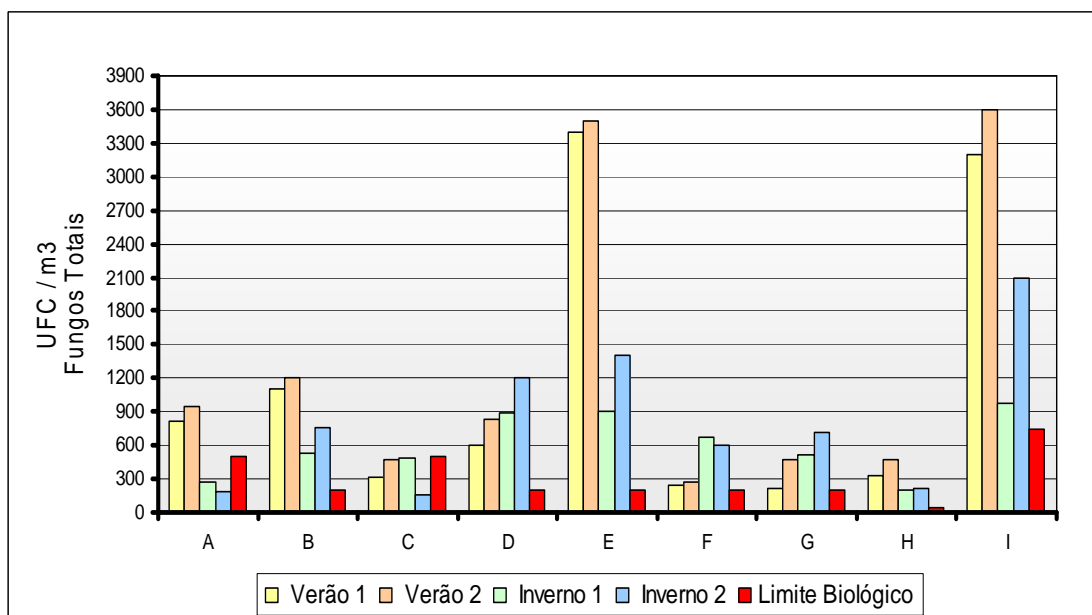
O monitoramento de bio-aerossois é uma área emergente que serve para medir microrganismos viáveis de ambientes internos e externos, incluindo avaliações da qualidade ambiental interna, doenças infecciosas, investigação epidemiológica e pesquisas (Manual of Analytical Methods, CDC - 1998). Até o presente momento, este é um dos poucos estudos focado na pesquisa de *C. neoformans* em fonte orgânica externa e ar interno no ambiente hospitalar.

As rotas de exposição humana a microrganismos aerotransportados ocorrem por inalação, ingestão e contato dérmico, embora a inalação seja a forma predominante. A amostragem e análise de microrganismos aerotransportados têm recebido atenção nos últimos anos pela preocupação com contaminação fúngica em ambientes internos, ameaça de bio-terrorismo e ocorrência de efeitos associados à saúde, incluindo doenças infecciosas, efeitos tóxicos agudo, alergias e até câncer. Os bioaerossois contribuem para 5 a 34% da poluição interna do ar. A contaminação fúngica depende de vários fatores incluindo umidade, temperatura, presença de matéria orgânica e, além disso, a carga fúngica externa (MEDRELA-KUDER, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Na amostragem microbiológica para fungos totais, também no mesmo período, houve crescimento significativo nos locais examinados, onde foram comparados com os valores limítrofes fornecidos pela CP 109 / 2003 ANVISA (Figura 13). Em todas as coletas, foi incluída uma amostra de ar externo como referência. Foram coletadas duas amostras em cada

estação do verão e do inverno calculados em UFC/m<sup>3</sup> (Unidade Formadora de Colônias por metro cúbico de ar). Os resultados são os seguintes: 820, 940 186 e 273 na Tomografia; 1100, 1200, 760 e 530 na Traumatologia; 320, 480, 160 e 485 na Radiologia; 600, 830, 1223 e 895 na Unidade Cardio-Clínica; 3380, 3520, 1380 e 900 na Enfermaria Cirúrgica; 250, 270, 603 e 673 na Unidade de Tratamento Intensivo; 210, 478, 716 e 524 no Bloco Cirúrgico; 335, 480, 213 e 203 na Unidade de Tratamento Intensivo de Queimados e finalmente a referência externa 3200, 3600, 2060 e 975. Este crescimento provavelmente pode estar associado aos seguintes fatores: acúmulo de matéria orgânica depositadas nos beirais internos do hospital, inadequada manutenção dos equipamentos de climatização e falta de remoção de sujidades nos ductos.

QUDIESAT *et al.*, (2009) atribuíram como causas das taxas elevadas de contaminantes aerotransportados em seus estudos: a idade do hospital, deficiência nas condições de higiene, número de leitos por ambiente e, precários sistemas de ventilação. Estes resultados também sustentam os nossos achados.



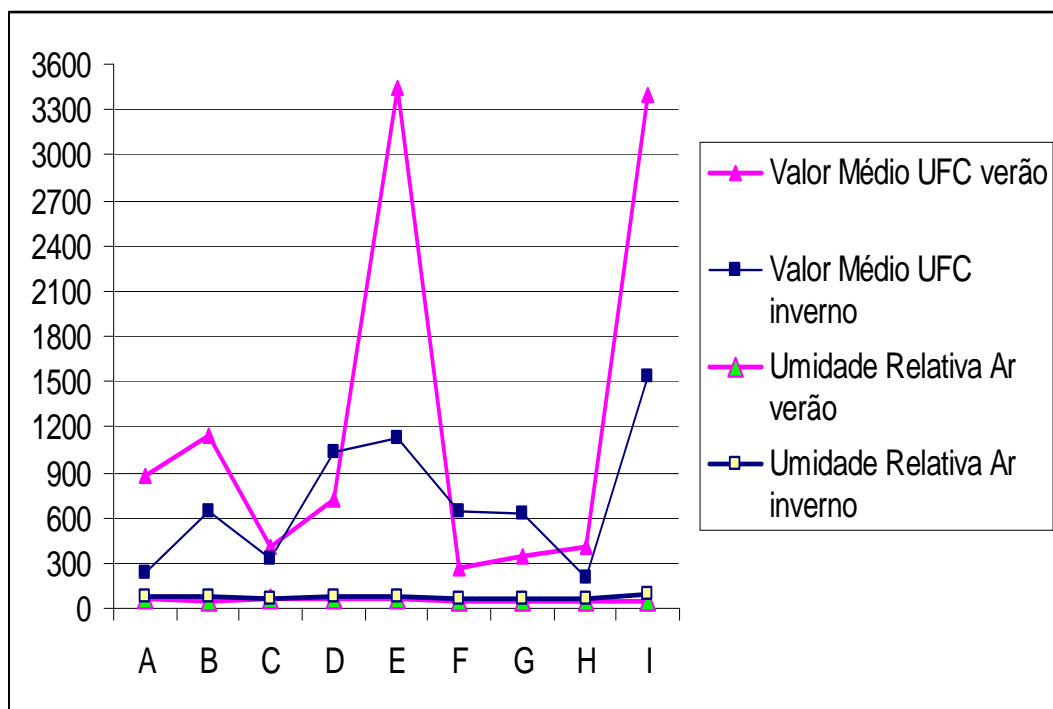
**Figura 13. Amostragem do ar utilizando como marcador epidemiológico o número de fungos viáveis.** A - Tomografia; B - Traumatologia; C - Radiologia; D - Unidade Cardio-Clínica; E - Enfermaria Cirúrgica; F - Unidade Tratamento Intensivo; G - Bloco Cirúrgico; H - Unidade Queimados e I - Área Externa e UFC: unidade formadora de colônias.

MARTINS-DINIZ *et al.*, (2005) monitoraram o ar interno de um hospital usando Amostrador de Andersen, e os valores encontrados foram 317,1 UFC/m<sup>3</sup> na UTI, 332,2 UFC/m<sup>3</sup> no Centro Cirúrgico e 673,5 UFC/m<sup>3</sup> na área externa do prédio; estes resultados comparados aos nossos demonstram que o nosso ambiente de pesquisa apresenta elevada contaminação fúngica .

Conforme a legislação vigente do país, a faixa recomendável de operação da Umidade Relativa, nas condições internas para verão, deve variar de 40% a 65%, e para condições internas no inverno, a faixa recomendável de operação deve variar de 35% a 65%. Em nossos achados a média no verão e inverno da tomografia foi de 66,7% e 76%; na traumatologia de 52% e 71,5%; na radiologia de 59% e 67%; na Unidade Cardio-Clínica de 62,8% e 73%; na Enfermaria Cirúrgica de 61,6% e 73%;

Unidade Tratamento Intensivo de 53,2% e 66%; no Bloco Cirúrgico de 63,1 e 68,8; Unidade Queimados foi 53% e 68,7% e na área externa 54% e 88%. Comparamos os valores da umidade relativa com a quantificação fúngica no ambiente interno, a fim de comprovar sua importância na influência do crescimento biológico. No inverno a umidade esteve em desacordo em todos os ambientes, entretanto o crescimento fúngico foi elevado nas duas estações (Figura 14). Nas coletas de excretas, no verão o aumento foi significativo, pois é necessário um ambiente mais seco para a proliferação dos esporos de *Cryptococcus*.

Os resultados obtidos demonstraram que a umidade tem influência direta sobre a proliferação fúngica.



**Figura 14. Relação umidade e crescimento fúngico.** A - Tomografia; B - Traumatologia; C - Radiologia; D - Unidade Cardio-Clínica; E - Enfermaria Cirúrgica; F - Unidade Tratamento Intensivo; G - Bloco Cirúrgico; H - Unidade Queimados e I - Área Externa e UFC: unidade formadora de colônias.

Uma pesquisa realizada em um hospital da França demonstrou ambientes externos e internos adequados, em unidades hematológicas adulto e pediátrica. A carga de fungos viáveis externo foi de 122,1 UFC/m<sup>3</sup> e nas respectivas unidades foi de 4,1 e 3,9 UFC/m<sup>3</sup> de ar. O baixo número de propágulos fúngicos encontrado pode ser resultado de condições ambientais controladas como a limitação de pessoas, proibição de abertura de janelas, presença móvel de um descontaminante de ar e equipamentos de climatização adequados para o ambiente (SAUTOUR *et al.*, 2009).

Recentemente foram avaliados 108 episódios de pneumonia de pacientes transplantados e os microrganismos mais freqüentes foram: *Pseudomonas aeruginosa* (33,3%), *Staphylococcus aureus* (26,8%), *Aspergillus* spp. (16%), *A. fumigatus* a espécie mais comum nos isolados respiratórios, seguidos de *Fusarium* spp., *C. neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis* (CAMPOS *et al.*, 2008). A criptococose é a terceira infecção mais comum por fungos invasivos em transplantados de órgãos sólidos, representando 8% (PAPPAS *et al.*, 2007).

Embora no Hospital avaliado neste trabalho não tenha Unidades de Tratamento a pacientes imunodeprimidos como transplantados, oncológicos e aidéticos, cabe relatar o uso constante de drogas potentes para seus tratamentos, o uso freqüente de respiração artificial, bem como uso de material/equipamento invasivo constantemente usado em UTIs, tais fatos conferem à pacientes imunossuprimido a possibilidade de desenvolver algum tipo de infecção hospitalar pelo tipo de ambiente que lhe é oferecido.

Hospitais e instalações de assistência à saúde são ambientes complexos e necessitam de ventilação adequada para conforto de pacientes e controle de emissões perigosas (CHUAYBAMROONG *et al.*, 2008; McCARTHY *et al.*, 2000). A taxa microbiana do ar interno hospitalar é altamente influenciada pelo número de ocupantes, suas atividades e ventilação. Os esporos fúngicos entram no hospital através de ductos de ventilação com inadequada filtração, e considerando que o ambiente estudado tem altos índices de matéria orgânica depositado muito próximos destes ductos há um excesso de fungos recuperados no ar. Foi observado que os filtros dos equipamentos de climatização não eram adequados com o ambiente, na maior parte das unidades do hospital o filtro utilizado nos

equipamentos foi G3, de acordo com a NBR 6401/1980, tem boa eficiência contra fração grossa ( $>5 \mu\text{m}$ ) da poeira atmosférica, mas não é adequado para as unidades estudadas, pois deve ser usado no mínimo F3, que confere alta eficiência contra partículas finas ( $1 - 5 \mu\text{m}$ ) sendo razoável contra fungos e bactérias.

Na maioria das amostragens de ar nos ambientes estudados, o crescimento fúngico excedeu o limite biológico indicado pela ANVISA, se mostrando compatível com o crescimento fúngico externo usado para meios comparativos (CP 109 / 2003 ANVISA).

Várias doenças bacterianas são transmitidas pelo ar como legionelose (aerossóis gerados pela água estagnada) ou tuberculose (aerossóis transmitidos de pessoas a pessoa). Doenças fúngicas causam infecções respiratórias e reações alérgicas que incluem uma grande variedade de agentes. Doenças virais são facilmente transmitidas por rotas aéreas, incluindo SARS (Síndrome Respiratória Aguda Severa) e viroses entéricas. Recentes estudos têm mostrado o aumento nas evidências de transmissão de aerossóis de infecções hospitalares como MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina), *Acinetobacter* spp e *Pseudomonas* spp. (BEGGS, 2003). De modo geral, a concentração da microflora interna de um ambiente de trabalho saudável é mais baixa que a concentração de ar externo no mesmo local (JENSEN e SCHAFER 1998).

Após a amostragem, o cultivo dos microrganismos deve ser enumerado e identificado, usando métodos apropriados de microscopia para identificação fúngica e bacteriana como Lactofenol e Gram, respectivamente. Técnicas da microbiologia clássica tal como observação das características do crescimento celular ou morfologia dos esporos e testes bioquímicos são essenciais, embora seja necessário longo tempo. Técnicas de biologia molecular tal como análise de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphic*) e PCR são técnicas aplicadas para identificação de fungos e bactérias. A técnica de PCR é rápida e precisa para identificação de fungos, mas são necessárias após amostragem dos fungos, a extração e purificação de DNA (PORTNOY *et al.*, 2005). A amplificação da região D2, uma extensa subunidade de rDNA dos fungos usando extração de DNA, amplificação, seqüenciamento e a classificação

da base de dados foram descritos. De 28 espécies, somente cinco não puderam ser identificadas (ROZYNEK *et al.*, 2004). Neste estudo não foi priorizado estas identificações pelo fato de ser a levedura *Cryptococcus* o objeto do trabalho.

A presença de muitos agentes biológicos no ambiente interior é devido à umidade e ventilação inadequada. A Ventilação acontece quando ar fresco entra em um edifício e substitui o ar em recinto fechado, removendo assim bio-aerossóis acumulados. Medir a concentração de CO<sub>2</sub> é o modo mais prático para calcular a suficiência de ventilação. A concentração de CO<sub>2</sub> em um edifício adequadamente ventilado deveria permanecer próxima aos níveis do ar livre. Concentrações de CO<sub>2</sub> aumentadas, particularmente se maior que 1000 partes por milhões, indica ventilação inadequada (AMERICAN SOCIETY of HEATING, 1989). Variáveis físicas como temperatura apresenta valores recomendados entre 21° C e 24°C respectivamente.

A temperatura média no verão variou entre 26°C e 32 °C dentro das unidades, estando fora dos padrões recomendados que fossem entre 21° e 24°C, e no período de inverno a média foi 23°C. A umidade no período de inverno teve uma variação de 66% a 88%, demonstrando a importância deste parâmetro como risco para contaminação interna do ar, devendo permanecer entre 40 e 60%, contribuindo para o aumento da proliferação fúngica. No verão, a umidade variou entre 52 e 66,7% e concentração de CO<sub>2</sub> no ambiente em estudo resultou em variações relevantes (Tabela 2).

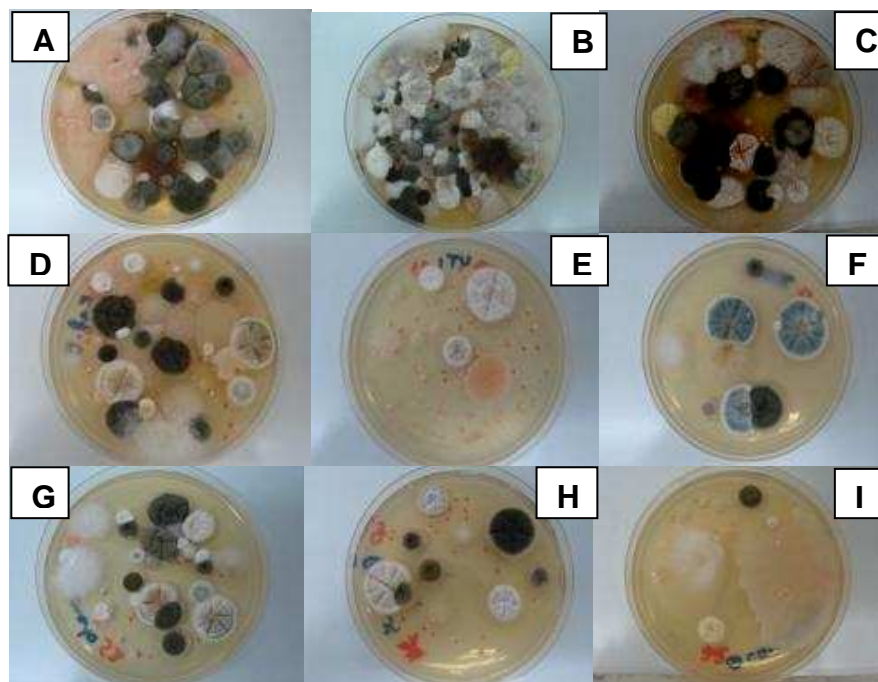
Em nossos resultados, a variação de CO<sub>2</sub> não ultrapassou o valor limítrofe, entretanto, se compararmos o resultado obtido externamente, em todos ambientes testados, demonstra saturação. Dessa forma, a falta de ventilação associada a ductos dos sistemas de climatização inadequados, pois foi observado elevado acúmulo de sujidades nas saídas dos ductos em todos ambientes, colabora para a quantidade excessiva de Unidades formadoras de colônias (UFC) encontradas nas amostragens microbiológicas de ar (Figura 15).



**Tabela 2. Umidade Relativa e concentração de CO<sub>2</sub> nos ambientes do hospital em estudo**

Unidades Hospitalares	UR [%]		CO <sub>2</sub> [ppm]	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
Tomografia	66,7	76	103	Zero
Traumatologia	52	71,5	500	276
Radiologia	59	67	330	110
Cardio-clínica	62,8	73	640	363
Enf. Cirúrgica	61,6	73	710	493
UTI-TR	53,2	66	1095	592
Bloco cirúrgico	63,1	68,8	285	284
Queimados	53	68,7	465	423
Externo	54	88	12	Zero

UR: Umidade Relativa - ppm: parte por milhão



**Figura15. Placas com crescimento fúngico dos ambientes amostrados com 100 L/ m<sub>3</sub> de Ar, exceto o Bloco Cirúrgico com amostragem de 500L / m<sub>3</sub>.**

A: Externo, B: Bloco Cirúrgico, C: Unidade Cardio-Clinica, D: Enfermaria Cirurgica, E: Unidade Tratamento Intensivo, F: Tomografia, G: Traumatologia, H: Radiologia, I: Unidade Queimados.

Para redução de bioaerossóis em ambientes internos certas medidas devem ser seguidas. Isto inclui adequada identificação e eliminação das fontes microbianas, manutenção de equipamentos, controle de umidade, ventilação natural, uso de filtros adequados em sistemas de climatização. No contexto dos cuidados médicos, os bioaerossóis podem causar riscos profissionais e infecções hospitalares e esse monitoramento pode se usado para localizar e identificar fontes de infecção hospitalar e sua disseminação, mas isto requer uma abordagem multidisciplinar (SRIKANTH *et al.*, 2008).

Na busca por melhores serviços á comunidade e ao corpo funcional, com auxilio desta pesquisa, foram colocadas redes de proteção em toda área que apresentava riscos e foram removidas as pombas, ninhos e excretas, tornando um ambiente mais adequado com os padrões sanitários.

Essas medidas vão reduzir ou até eliminar a presença de *Cryptococcus* no ambiente hospitalar, assim como a redução do alto índice de fungos no ar.

## **6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**

- Embora houvesse uma presença significativa de *C. neoformans* encontrados nas excretas, não foi recuperado nenhum isolado no ar. Entretanto faz-se necessário um maior número de amostragem desta fonte.
- Em relação à concentração de fungos no ar, a Radiologia em todas as amostragens a área de Tomografia na amostragem do inverno esteve dentro dos padrões recomendados pela RE nº9/2003, enquanto que as unidades mais complexas do hospital estão totalmente em desacordo no que se refere à quantificação fúngica.
- Se aplicarmos a proposta da ANVISA – CP 09 –conforme o nível de risco, somente a Radiologia estaria em conformidade em todas as amostragens e a tomografia apenas na terceira e quarta amostragem para fungos.
- A amostragem externa que satisfaz como referência a coleta interna está integralmente em desacordo com a legislação vigente, comprovando que fontes poluentes de origem orgânica são fundamentais na contaminação do ar.
- A qualidade do ar é diretamente afetada pelo estado de conservação dos equipamentos do sistema de ventilação.
- A temperatura foi medida em todas as amostragens, e apenas no inverno (3ª coleta), que esteve em acordo com a resolução RE nº9 da ANVISA;

- A taxa de dióxido de carbono esteve em desacordo na Unidade de Tratamento Intensivo ultrapassando o limite de 1000ppm no período do verão.
- No período de inverno a umidade relativa do ar esteve em todas as amostragens fora dos padrões sanitários recomendados pela ANVISA, o que sugere forte influência na proliferação fúngica do ar interno.
- Desenvolver diretrizes na prevenção de problemas com a Qualidade do Ar Interno como descrição das características da estrutura da instituição, função e condições de ocupação pode influenciar na qualidade do ar interno.
- Um plano de gerenciamento pode organizar as atividades a serem desenvolvidas. Programas de treinamento e de educação para funcionários e ocupantes do prédio devem ser providenciados para garantir que os procedimentos sejam entendidos e aplicados.
- É necessário um responsável pela qualidade do ar, com responsabilidades claramente definidas, esse perfil pode colaborar com o setor de gerenciamento a identificar áreas potencialmente problemáticas priorizando orçamentos para manutenção e modificações futuras.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABEGG MA, CELLA FL, FAGANELLO J, VALENTE P, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*, 161:83-91, 2006.
- ABNT/ NBR 6401 – Instalações centrais de ar-condicionado para conforto  
Parâmetros básicos de projeto.
- ABNT/NBR-7256 – Tratamento de Ar em Estabelecimentos Assistenciais de Saúde.
- ALSPAUGH, J. A., PERFECT, J. R., AND HEITMAN, J. Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* 25, 1–14, 1998.
- AMERICAN SOCIETY OF HEATING, Refrigeration and Air Conditioning Engineers. Standard 62-1989, The Society, Atlanta (GA), 1989.
- AOKI F.H.; IMAL, T; TANAKA, R.; MIKAMI, Y.; TAGUCHI, H.; NISHIMURA, N.F.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; SCHREIBER, A. Z. & BRANCHINI, M.L.M. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. *J Clin Microbiol*, 37: 315-320, 1999.
- BAHN, Y.S., COX, G.M., *et al.*, Carbonic anhydrase and CO<sub>2</sub> sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. *Curr. Biol.* 15 (22), 2013–2020, .2005.
- BALTAZAR L.M. & RIBEIRO M.A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Medicina Tropical.* 41(5): 449-453. 2008.
- BARCHIESI, F., COGLIATI, M., ESPOSTO, M. C., SPREGHINI, E., SCHIMIZZI, A. M., WICKES, B. L., SCALISE, G. & VIVIANI, M. A. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. *J Infect* 51, 10–16, 2005.
- BARONI, F. D. A., C. R. PAULA, É. G. DA SILVA, F. C. VIANI, I. N. G. RIVERA, M. T. B. DE OLIVEIRA, AND W. GAMBALE. - *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 48: 71-75, 2006.
- BEGGS CB. The Airborne Transmission of Infection in Hospital Buildings: Fact or Fiction? *Indoor Built Environ* 12:9-18, 2003.

- BEMIS, D.A., KRAHWINKEL, D.J., *et al*, Temperature-sensitive strain of *Cryptococcus neoformans* producing hyphal elements in a feline nasal granuloma. *J. Clin. Microbiol.* 38 (2), 926–928, 2000.
- BOEKHOUT T, THEELEN B, DIAZ M, FELL JW, HOP WCJ, ABELN ECA, DROMER F & MEYER W.;Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 147 (Pt4), 891-907, 2001.
- BOVERS M, HAGEN F, BOEKHOUT T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. *Rev. Iberoam. Micol.* 25:S4–12, 2008.
- BOYTON RJ, ALTMANN DM, WRIGHT A, KON OM: Pulmonary Infection with *Cryptococcus neoformans* in the Face of Underlying Sarcoidosis. *Respiration* 2007;
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº. 176, de 24 de outubro de 2000. Orientação Técnica sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002, dispõe sobre Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº. 9, de 16 de setembro de 2003. Orientação Técnica sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº:109, de 12 de dezembro de 2003. Orientação Técnica sobre Qualidade do ar Ambiental Interior em Serviços de Saúde - Diário Oficial da União nº242.
- BUNTING, L.A. *et al.*, *Cryptococcus neoformans*: gastronomic delight of a soil amoeba, *Sabouraudia* 17 pp. 225–232, 1979.
- CAICEDO, LD, ALVAREZ, MI, DELGADO, M, CARDENAS, A, *Cryptococcus neoformans* in bird excreta in the city zoo of Cali, Colombia. *Mycopathologia* 147 (3), 121–124, 1999.
- CAMPOS, S; CARAMORI, M;TEIXEIRA,R; AFONSO JR, J; CARRARO,R; STRABELLI, T; SAMANO,M; PÊGO-FERNANDES, P; JATENE. F; Bacterial and Fungal Pneumonias After Lung Transplantation - *Transplantation Proceedings*, 40:822-824, 2008.

- CARVALHO, V.G.; TERCETI, M.S.; DIAS, A.L. *et al.* - Serotype and mating type characterization of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 49:207-210, 2007.
- CASADEVALL A., PERFECT JR., *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press; 1998.
- CASADEVALL, A.L. ROSAS AND J.D. NOSANCHUK, Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol* 4pp. 354–358, 2000.
- CASALI, A. K. GOULART, L., SILVA, L. K. R, RIBEIRO, Â. M., AMARAL, A. A., ALVES, S. H., SCHRANK, A., MEYER, W., VAINSTEIN, M. H. Molecular typing of Clinical and Environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian State Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Research*, 1559: 1-11, 2003.
- CASTELLÁ G, ABARCA ML, CABAÑES FJ. Cryptococcosis and pets. *Rev Iberoam Micol.* 25(1):S19-24. 2008.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Draft Guideline For Environmental Infection Control in Healthcare Facilities, 2001.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Cryptococcosis technical information [online]. CDC; 2003 Dec. Available at: [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cryptococcosis\\_t.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cryptococcosis_t.htm). Acessado out./2009.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC, 2006
- CHAKRABARTI, A., JATANA, M., KUMAR, P., CHATHA, L., KAUSHAL, A., PADHYE, A. A., Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from Eucalyptus camaldulensis in India. *J. Clin. Microbiol.* 35 (12), 3340–3342, 1997.
- CHATURVEDI S, RODEGHIER B, FAN J, MC CLELLAND CM, WICKES BL, CHATURVEDI V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT $\alpha$  and MAT *a* Pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. *J Clin Microbiol*; 38:2007-2009, 2000.
- CHRISTENSEN, W.B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J Bacteriol*, 52:461-466; 1946.
- CHUAYBAMROONG P, CHOOMSEER P, SRIBENJALUX P, Comparison between hospital single air unit and central air unit for ventilation performances and airborne microbes. *Aerosol and Air Qual. Res*, 8(1): 28-36; 2008.

- COSTA, A. K., SIDRIM, J. J., CORDEIRO, R. A., BRILHANTE, R. S. N., MONTEIRO, A. J. & ROCHA, M. F. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeast: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia*. V. 169 (3): 207-213, 2009.
- COX GM, MUKHERJEE J, COLE GT, *et al.* Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun*; 68(2):443–8, 2000.
- DEL POETA, MD; TOFFALETTI,DL; RUDE, TH; DYKSTRA, CC; HEITMAN, J & PERFECT, JR; Topoisomerase I is essential in *Cryptococcus neoformans*: role in pathobiology and as an antifungal target. *Genetics*, 152:167-178, 1999.
- DEL VALLE L, PINA-OVIEDO S., HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. *Front Biosci* 11: 718–732, 2006.
- DENTON, J. F., AND SALVO, A. DI. The prevalence of *Cryptococcus neoformans* in various natural habitats. *Sabouraudia*, 6:213–217, 1968.
- DIXIT A, CARROLL SF, QURESHI ST. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2009:840452. 2009
- DYKSTRA, M.J.; LOOMIS, M.; REININGER, K.; ZOMBECK, D.; FAUCETTE, T. A comparison of sampling methods for airborne fungal spores during an outbreak of aspergillosis in the forest aviary of the North Carolina zoological park. *J. Zoo Wildlife Med.*, v. 28, n. 4, p. 454-463, 1997.
- EMMONS, C. W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J. Bacteriol*, 62: 685-690, 1951 *apud* Casadevall, A. & Perfect, J. R. *Cryptococcus neoformans*. *Library of Congress*, 1998.
- EMMONS, C. W. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. *Public Health Rep*, 75: 362-364, 1960 *apud* Casadevall, A. & Perfect, J. R. *Cryptococcus neoformans* *Library Of Congress*, 1998.
- ERGIN C, ILKIT M, KAFTANOGLU O., Detection of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Mycoses* 47:431–34, 2004.
- ESCANDÓN, P.; SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ, M.; MEYER, W. AND CASTAÑEDA, E.; Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS Yeast Research* 6: 625–635, 2006.
- FAGANELLO J, DUTRA V, SCHRANK A, MEYER W, SCHRANK IS, VAINSTEIN MH. Identification of genomic differences between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by Representational Difference Analysis (RDA). *Med Mycol*. 47(6):584-91. 2009



- FALVEY D.G AND STREIFEL, A.J., Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital, *J Hosp Infect* 67:35–41, 2007.
- FAURE O., FRICKER-HIDALGO H., LEBEAU B., MALLARET MR, AMBROISE-THOMAS P., GRILLOT R. Eight-year surveillance of environmental fungal contamination in hospital operating rooms and hematological units. *J Hosp Infect*, 50:155-160; 2002.
- FEDERAL-PROVINCIAL ADVISORY COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL AND OCCUPATIONAL HEATH. Exposure Guidelines for Residential Indoor Air Quality. Internet: <http://www.hc-sc.gc.ca> 1989.
- FILION, T., KIDD, S., *et al.*, Isolation of *Cryptococcus laurentii* from Canada Goose guano in rural upstate New York. *Mycopathologia* 162 (5), 363–368, 2006.
- FRASÉS S, FERRER C, SÁNCHEZ M, COLOM-VALIENTE MF.; Molecular Epidemiology of Isolates of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex from Spain. *Rev Iberoam Micol.* 26(2):112-7, 2009.
- GANGNEUX JP, ROBERT-GANGNEUX F, GICQUEL G, TANQUEREL JJ, CHEVRIER S, POISSON M, AUPEC, EM, GUIGUEN C. Bacterial and fungal counts in hospital air: comparative yields for 4 sieve impactor air samplers with 2 culture media. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 27:1405–1408, 2006.
- GHANNOUM MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 13(1):122–43, 2000.
- GRANADOS, D.P., CASTANEDA, E., Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogota, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microb. Ecol.* 49 (2), 282–290, 2005.
- Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities - Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Atlanta, GA 30333, 2001.
- HAINES, R. W., WILSON. C. L., HVAC Systems Design Handbook. 3<sup>a</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 528p ISBN: 0070259631. 1998.
- HORTA JA, STAATS CC, CASALI AK, RIBEIRO AM, SCHRANK IS, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian State Rio Grande do Sul. *Medical Mycology*, 40:1-7, 2002.
- JENSEN PA, SCHAFFER MP eds. Sampling and characterization of bio-aerosols, Chapter J. In: NIOSH Manual of Analytical Methods. 82-112, 1998. Available at: <http://www.cdc.gov/niosh/nmam/pdfs/chapter-j.pdf>. Accessed Dec 05, 2008.

- KHAN, Z. U.; AL-ANEZI, A.A.; CHANDY, R.; XU, J. Disseminated Cryptococcosis in na AIDS patient caused by a canavanine-resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *J Med Microbiol*, v.52, p.271-275, 2003.
- KELLER, S. M., VIVIANI, M. A., ESPOSTO, M. C., COGLIATI, M. & WICKES, B. L., Molecular and genetic characterization of a serotype A MATa *Cryptococcus neoformans* isolate. *Microbiology* 149:131–142, 2003.
- KIDD, S. E., HAGEN F., TSCHARKE R. L., HUYNH M., BARTLETT K. H., FYFE M., MACDOUGALL L., BOEKHOUT, T., KWON-CHUNG K. J. & MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:17258-63, 2004.
- KIDD, S. E., Y. CHOW, S. MAK, P. J. BACH, H. CHEN, A. O. HINGSTON, J. W. KRONSTAD, AND K. H. BARTLETT. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (5), 1433–1443, 2007.
- KLEIN, K. R., HALL, L., DEML, S. M. , RYSAVY, J. M. , WOHLFIEL, S. L. AND WENGENACK, N. L., Identification of *Cryptococcus gattii* by Use of L-Canavanine Glycine Bromothymol Blue Medium and DNA Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 47:3669-3672, 2009.
- KWON-CHUNG, K. J., AND J. E. BENNETT; Distribution of alpha and a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates *Am. J. Epidemiol.* 108:337–340, 1978.
- KWON- CHUNG, K.J., POLACHECK, I. & BENNETT, J.E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A e D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B e C). *J Clin Microbiol*, 15: 535-537, 1982.
- KWON-CHUNG, K. J., BENNETT, J.E., RHODES, J.C. Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 48: 25-38, 1982.
- KWON-CHUNG KJ, RHODES JC. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 51(1):218–23, 1986.
- KWON-CHUNG KJ, BENNETT JE, Cryptococcosis. In KJ Kwon-Chung, JE Bennett (eds.), *Medical Mycology*, Lea & Febiger, Philadelphia, p.397-446, 1992.
- KWON-CHUNG KJ, EDMAN JC, WICKES BL. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 60(2): 602–5, 1992.

- KWON-CHUNG K.J, BOEKHOUT T, FELL JW, DÍAZ M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*; 51: 804-806, 2002
- LAZERA M S, SALMITO M A, LONDERO AT, *et al.* Posible primery ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Méd Mycol.* 38: 379-383, 2000.
- LEAL AL, FAGANELLO J, FUENTEFRIA AM, BOLDO JT, BASSANESI MC, VAINSTEIN MH. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*, 166:71-5, 2008.
- LEE KS, BARTLETT KH, BRAUER M *et al* ; A field comparison of four samplers for enumerating fungal aerosols I sampling characteristics. *Indoor Air* 14:360–366, 2004.
- LESTER SJ, KOWALEWICH NJ, BARTLETT KH, KROCKENBERGER MB, FAIRFAX TM, MALIK R. Clinicopathologic features of an unusual outbreak of cryptococcosis in dogs, cats, ferrets, and a bird: 38 cases (January to July 2003). *J Am Vet Med Assoc.* 1; 225(11):1716-22. 2004
- LI CS, HOU PA. Bioaerosol characteristics in hospital clean rooms. *Sci Total Environ* 305, 169-176, 2003.
- LIN, X., HEITMAN, J., The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:69-105, 2006.
- LIN X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution.* 9:401–416, 2009;
- LITTMAN, M. L., AND BOROK R. Relation of pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 35:329–345, 1968.
- LITTMAN M L, TSUBURA E. Effect of degree of encapsulation upon virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Proc Soc Exp Biol Med.* 101:773–777, 1959.
- LITTMAN, M.L. Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*, *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 20:623–648, 1958.
- LITVINTSEVA, A.P., THAKUR, R., VILGALYS, R. AND MITCHELL, T.G., Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana, *Genetics* 172, pp. 2223–2238, 2006.
- LUGARINI, C.; GOEBEL, C.S.; CONDAS, L. A. Z.; MURO, M. D.; FARIAS, MARCONI RODRIGUES; MONTIANI-FERREIRA, F.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine Bird Excreta in the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*, v. 166, p. 61-69, 2008.

- 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. *Rev. Saúde Pública.* 39:398-405., 2005.
- MC DONALD, L.C.; WALKER, M.; CARSON, I.; ARDUINO, M. Outbreak of *Acinetobacter spp.* Bloodstream infections in a nursery associated with contaminated aerosols and air conditioners. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 17: 176-722. 1998.
- McCARTHY J, LUSCUERE P, STREIFEL A, KALLIOKOSKI P, Indoor air quality in hospitals and other health care facilities. In Proceeding of Healthy Buildings 2000, *Espoo, Finland.* 2000.
- McCLELLAND, E. E., BERNHARDT, P., CASADEVALL, A. Estimating the Relative Contributions of Virulence Factors for Pathogenic Microbes. *Infect. Immun.* 74: 1500-1504, 2006.
- MEDRELA-KUDER E. Seasonal variations in the occurrence of culturable airborne fungi in outdoor and indoor air in Cracow. *Int Biodeterior Biodegrad* 52:203–5, 2003.
- MEYER W, MARSZEWSKA K, AMIRMOSTOFIAN M, IGREJA RP, HARDTKE C, *et al*; Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 20:1790–99, 1999.
- MEYER, W.; CASTAÑEDA, A., JACKSON, S. HUYNH, M., CASTAÑEDA,, E. AND THE IBEROAMERICAN CRYPTOCOCCAL STUDY GROUP - Molecular typing of Iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg. infect. Dis.*, 9: 189-195, 2003.
- MOHR AJ. Fate and Transport of Microorganisms in Air, Chapter 74. In: Manual of Environmental Microbiology, 2nd ed. Hurst CJ, Crawford RL, Knudsen G, McInerney M, Stetzenbach LD, Eds. (ASM Press, Washington DC), 827-38; 2002.
- MORRIS, G.; KOKKI, M.; RICHARDSON, M. Methods for sampling ***Aspergillus*** spores in air. Disponível em: <http://www.aspergillus.man.ac.uk/secure/richard.htm>1999.
- NESA, D.; comparative performance of impactador air sampler for quantification of fungal contamination, *J .Hosp Infect* 47:149–55, 2001.
- NGAMSKULRUNGROJ P, GILGADO F, FAGANELLO J, LITVINTSEVA AP, LEAL AL, TSUI KM, MITCHELL TG, VAINSTEIN MH, MEYER W. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that

- Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. PLoS One. 10;4(6):e5862. 2009
- NIELSEN, K., DE OBALDIA, A.L., *et al.*, *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryot. Cell* 6 (6), 949–959, 2007.
- NIOSH - National Institute for Occupational Safety and Health,: disponível em [www.cdc.gov/niosh/topics/indoorenv/ConstructionIEQ.html](http://www.cdc.gov/niosh/topics/indoorenv/ConstructionIEQ.html), revisada em 2009.
- NISHIKAWA MM, LAZERA MS, BARBOSA GG, TRILLES L, BALASSIANO BR, MACEDO RC, BEZERRA CC, PÉREZ MA, CARDARELLI P, WANKE B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol* 41: 73-77, 2003.
- NOSANCHUK, J.D.; J. RUDOLF, A.L. ROSAS AND A. CASADEVALL, Evidence that *Cryptococcus neoformans* is melanized in pigeon excreta: implications for pathogenesis. *Infect Immun* 67 pp. 5477–5479, 1999.
- OLIVEIRA M, RIBEIRO H, ABREU I. Annual variation of fungal spores in atmosphere of Porto. *Ann Agric Environ Med* 12:309–15, 2003.
- ORTIZ, G.; YAGÜE, G.; SEGOVIA, M.; CATALÁN, V. A Study of Air Microbe Levels in Different Areas of a Hospital, *Current Microbiology*, v.59, n1 , p. 53-58. 2009.
- PADRÃO. Referencial Brasileiro Microbiológico. *Revista Brasindoor*, v.2, nº 10, p.21, jul./agos./set./ 1998.
- PAL M, ONDA C, HASEGAWA A.; Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans*. *Nippon Juigaku Zasshi* 52:1171–74, 1990.
- PAPPAS PG, KAUFMANN C, ALEXANDER B, *et al.* Prospective surveillance of invasive fungal infections (IfIs) among organ transplant recipients (OTRs) in the US 2001–2006. In: Program and abstracts of the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Chicago). Washington, DC: American Society for Microbiology, 2007.
- PASSONI LFC, WANKE B, NISHIKAWA MM, LAZÉRA MS. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: An analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Medical Mycology* 36: 305-311, 1998.
- PCMSO - PROGRAMA DE CONTROLE MÉDICO DE SAÚDE OCUPACIONAL- NR 7
- PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C. Diagnóstico laboratorial da criptococose. *NewsLab* - edição 77, p. 94-102, 2006.

- PEDROSO RS, FERREIRA JC, CANDIDO RC. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiol Res*, in press, 2007.
- PERDELLI F, CRISTINA ML, SARTINI M *et al.* Fungal contamination in hospital environments. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27:44–47; 2006.
- PINI G, DONATO R, FAGGI E, FANCI R. Two years of a fungal aerobiocontamination survey in a Florentine haematology ward. *Eur J Epidemiol* 19, 693-698; 2004.
- PORTNOY JM, KENNEDY K, BARNES C. Sampling for indoor fungi: what the clinician needs to know. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 13:165–170, 2005.
- PPRA - Programa de Prevenção de Riscos Ambientais - NR 9
- PRAKITCHAIWATTANA CJ, FLEET GH, HEARD GM. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyze the yeast ecology of wine grapes, 2004.
- Public Employees Occupational Safety and Health - PEOSH - Indoor Air Quality. <http://www.state.nj.us/health/eoh/peoshweb/iaqdoc.htm>. Accessed January 25, 2007.
- QUADROS, M. E.; LISBOA, H.M.; OLIVEIRA, V.L.; SCHIRMER, W.N. Qualidade do ar interno em ambientes hospitalares. *Rev. Tecnologia*, Fortaleza, v.30, n.1, 38 p.38-52, 2008.
- QUDIESAT, K., ABU-ELTEEN, K., ELKARMI, A., HAMAD, M., & ABUSSAUD, M., Assessment of airborne pathogens in healthcare settings. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 66–76, 2009.
- RAINER J, PEINTNER U, PODER R.; Biodiversity and concentration of airborne fungi in a hospital environment. *Mycopathologia*, 149: 87-97; 2001.
- RAKESH, V., SCHWEITZER, A. D., ZARAGOZA, O., BRYAN, R., WONG, K., DATTA, A., CASADEVALL, A., AND DADACHOVA, E.; Finite-Element Model of Interaction between Fungal Polysaccharide and Monoclonal Antibody in the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *J. Phys. Chem. B* 112, 8514–8522, 2008.
- RANDHAWA, H.S., KOWSHIK, T., ET AL., Distribution of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in decayed trunk wood of *Syzygium cumini* trees in north-western India. *Med. Mycol.* 44 (7), 623–630, 2006.
- REOLON, A.; PEREZ, L. R. R. AND MEZZARI, A.; Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto

- Alegre, Rio Grande do Sul. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* [online], 40, n.5, 2004.
- REFOJO N, PERROTTA D, BRUDNY M, ABRANTES R, HEVIA A. I, DAVEL G.; Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. *Medical Mycology* 47:177 – 184, 2009.
- RIVERA, J., FELDMESSER, M., CAMMER, M., AND CASADEVALL, A.; Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. *Infect. Immun.* 66, 5027–5030, 1998.
- RODRIGUES, M. L., NAKAYASU, E. S., OLIVEIRA, D. L., NIMRICHTER, L., NOSANCHUK, J. D., ALMEIDA, I. C., AND CASADEVALL, A. ; Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell* 7, 58–67, 2008.
- ROSAS A.L. AND CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol Lett* 153:265–272, 1997.
- ROZYNEK P, GILGES S, BRUNING T, WILHELM M. Quality test of the MicroSeq D2 LSU Fungal Sequencing Kit for the identification of fungi. *Int J Hyg Environ Health*; 207:297—299, 2004.
- RUIZ, A, BULMER, G S Particle size of airborne *Cryptococcus neoformans* in a tower. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:1225-1229, 1981.
- SALUSTIANO, V.C., ANDRADE, N.J., BRANDÃO, S.C.C., AZEREDO, R.M.C. and LIMA, C.A.K. Microbiological air quality of processing areas in dairy plant as evaluated by sedimentation technique and a one stage air sampler. *Braz. J. Microbiol.* 34, 255–259, 2003.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T.; Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 5.1-5.95, 10.1-10.70, 11.1-11.61, 14.1-14.35, 1989.
- SANFELICE, F. - Contributo alla morfologia e biologia dei blastomicetiche si sviluppano nei succhi di alcuni fruttii. Istituto d'Igiene della R. Università di Cagliari, 4: 463-498, 1884.
- SAUTOUR, M., SIXT, N., DALLE, F., L'OLLIVIER, C., FOURQUENET, V. & CALINON C. *et al.*, Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Sci Total Environ* 407:3766–3771, 2009.
- SAYER, WJ; SHEAN, DB; GHOSSEIRI, BS; Estimation of airborne fungal by the Andersen sampler versus the gravity settling culture plate. *J. Allergy*, 15:214-227, 1969.

- SCHWARTZ MI; KING TE JR , CHERNIACK RM; General principles and diagnostic approach to the interstitial lung disease. In Murray JF , Nadel JA: *Textbook of Respiratory Medicine*, 2° ed Philadelphia, W.B. Saunders p 1803-1826,1994.
- SHARPTON TJ, NEAFSEY DE, GALAGAN JE, TAYLOR JW. Mechanisms of intron gain and loss in *Cryptococcus*. *Genome Biol.* 30:9(1):R24. 2008
- SIMKHOVICH B. Z., KLEINMAN, M. T., KLONER, R. A., *Air Pollution and Cardiovascular Injury: Epidemiology, Toxicology, and Mechanisms. Journal Am. Coll. Volume 52, Issue 9 P. 719-726, 2008.*
- SOARES, M.C.B.; PAULA, C.R.; DIAS, A.L.T.; CASEIRO, M.M. & COSTA, S.O.P. - Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 47:31-36, 2005.
- SORRELL TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol*;39(2):155–68, 2001 .
- SRIKANTH, P.; SUDHARSANAM, S.; STEINBERG, R. Bio-aerosols in indoor environment: Composition, health effects and analysis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 26, n. 4, p. 302-312, 2008.
- STAIB, F. The perfect state of *Cryptococcus neoformans*, *Filobasidiella neoformans*, on pigeon manure filtrate agar. *Zentralbl. Bakteriologie A* 248 (4), 575–578, 1981.
- STAIB, F., SEIBOLD, M., ANTWEILER, E., FROHLICH, B., WEBER S., AND BLISSE, A. The brown color effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. *Zbl Bakt Hyg A*, **266** pp. 167–177, 1987.
- STATHOLOUPOU, O.I. *et al* . An experimental study of air quality inside large athletic halls. *Building and Environmental*, p.834-848, 2008.
- SUNDELL, J. On the history of indoor air quality and health. *Indoor Air*, v. 14, n. Suppl. 7, p. 51-58. 2004.
- TORRES-RODRIGUEZ, J. M. ALVARADO-RAMIREZ, E. & GUTIERREZ-GALLEGO R.; Diferencias en la actividad de la enzima ureasa entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25:27–31, 2008.
- TRILLES L, LAZERA M, WANKE B, OLIVEIRA RV, BARBOSA GG, NISHIKAWAMM, MORALES BP, MEYER W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 455-462, 2008.



- VARTIVARIAN, S. E.; ANAISSIE, E. J.; COWART, R.E.; SPRIGG, H. A.; TINGLER, M.J; ACOBSON, E. S. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. *J. Infect Dis.* 167:186-190, 1993.
- VANBREUSEGHEM, R., AND TAKASHIO, M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. *Ann. Soc. Belges. Med. Trop. Parasitol. Mycol.* 50, 695–702, 1970.
- WANG, Y. AND A. CASADEVALL. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-DOPA decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2648-2650, 1994.
- WILKIE K, MACHER J. Air sampling. In: Macher J, editor. Bioaerosols assessment and control. *Cincinnati: ACGHI*; p. 11-1 to 11-25, 1999.
- WILLIANSO, P. R.; WAKAMATSU, K. & ITO, S.; Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*,180 (6): 1570 – 1572, 1998.
- WONG B, PERFECT JR, BEGGS S, *et al.* Production of the hexitol D-mannitol by *Cryptococcus neoformans in vitro* and in rabbits with experimental meningitis. *Infect Immun*; 58(6):1664–70, 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Copenhagen, Denmark: World Health Organization, 1988.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: Programmes and Projects: Indoor Air Pollution. Disponivel em: [www.who.int/indoorair/en](http://www.who.int/indoorair/en) 2008
- XU J, VILGALYS R, MITCHELL TG. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Ecol.* 9(10):1471-81, 2000
- ZARAGOZA, O., AND CASADEVALL, A.; Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol. Proced. Online* 6, 10–15, 2004.