

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**PESQUISA DE CRIPTOCOCOSE EM CÃES ATENDIDOS NO  
HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA UFRGS, PORTO  
ALEGRE, BRASIL.**

**Izamara Aparecida de Oliveira**

**Dissertação apresentada para  
obtenção do título de Mestre,  
junto à Faculdade de Medicina  
Veterinária da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul  
Área de concentração:  
Micologia Veterinária  
Orientador:  
Prof. Dr. Laerte Ferreira**

**Porto Alegre  
2005**

Aos meus pais, **Emerson e Zaira**, pelo exemplo de simplicidade, coragem, força e amor. Por acreditarem em mim e simplesmente por existirem em minha vida. Amo vocês.

Aos **animais**, motivo de minha escolha profissional.

## AGRADECIMENTOS

Ao amigo e orientador **Laerte Ferreira**, pela confiança a mim depositada desde a graduação, pela sua dedicação e encorajamento, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

À amiga e colega de pós-graduação **Edna Maria Cavallini Sanches**, por ter sempre uma palavra de conforto e incentivo nos momentos difíceis, pelos conselhos, carinho, amizade e auxílio.

À amiga e bolsista do Laboratório de Micologia **Adriana Cunha Muschner**, pelo carinho, companheirismo, amizade e incentivo.

À colega de pós-graduação **Marina Venturini Copetti**, pela amizade, incentivo e auxílio na execução deste trabalho.

Ao amigo **Elsio Augusto Wunder Júnior**, pelo apoio, incentivo e carinho.

Aos colegas do Laboratório de Virologia e a funcionária **Orema Souza**, pelo apoio e solidariedade.

Aos colegas do setor de Patologia Veterinária UFRGS pelo apoio técnico.

Ao **Flávio de Mattos Oliveira**, do IPD da Santa Casa de Misericórdia, pelo apoio técnico.

Ao médico veterinário **Rodolfo Voll**, pelo auxílio na coleta do material, indispensável na execução deste trabalho.

À amiga e funcionária do HCV-UFRGS, **Rejane Barcelos**, pelo auxílio na coleta do material, pelo carinho e incentivo nos momentos difíceis.

Aos médicos e funcionários do HCV-UFRGS, pelo apoio e solidariedade.

Ao **PPG em Ciências Veterinárias**, pelo auxílio constante.

À **CAPES**, pela Bolsa de Estudo que permitiu a execução deste trabalho.

Aos meus irmãos, **Emerson Júnior e Marco Aurélio**, pelo incentivo e carinho constantes.

Ao **João Francisco Bisol**, pelo estímulo, paciência, dedicação e amor.

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Situação de exposição de 59 cães (atendidos no HCV - UFRGS, no período de 2003/2004) a ambientes possivelmente contaminados com propágulos fúngicos de <i>Cryptococcus</i> .....	27
--	----

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1 -** Cão, selecionado para amostragem do grupo de animais com sintomatologia respiratória, apresentando abundante secreção nasal purulenta.....22

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Histórico</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>Características Gerais da Levedura <i>Cryptococcus neoformans</i></b> .....	13
<b>2.3</b>	<b>Criptococose nos Animais</b> .....	15
<b>2.4</b>	<b>Criptococose nos Cães</b> .....	17
<b>2.5</b>	<b>Diagnóstico</b> .....	18
<b>2.5.1</b>	Exame Direto.....	19
<b>2.5.2</b>	Cultivo.....	19
<b>2.5.3</b>	Teste de Aglutinação em Látex.....	20
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
<b>3.1</b>	<b>Amostragem</b> .....	21
<b>3.2</b>	<b>Coleta das Amostras</b> .....	22
<b>3.2.1</b>	Secreção Nasal.....	22
<b>3.2.2</b>	Sangue Total.....	23
<b>3.2.3</b>	Soro.....	23
<b>3.2.4</b>	Líquido Cefalorraquidiano.....	23
<b>3.3</b>	<b>Processamento das Amostras</b> .....	24
<b>3.3.1</b>	Exame Direto.....	24
<b>3.3.2</b>	Cultivo.....	24
<b>3.3.3</b>	Aglutinação em Látex.....	24
<b>3.3.3.1</b>	Protocolo Qualitativo do Crypto-LA Teste.....	25
<b>3.3.3.2</b>	Interpretação do Resultado Qualitativo.....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	26
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	33
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	34
	<b>APÊNDICE A – Preparação do Meio de Cultivo Ágar Níger</b> .....	40
	<b>APÊNDICE B – Teste de Aglutinação em Látex</b> .....	41

## RESUMO

### PESQUISA DE CRIPTOCOCOSE EM CÃES ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA UFRGS, PORTO ALEGRE, BRASIL.

Criptococose é uma levedurose que acomete o homem e vários animais, podendo ocorrer em indivíduos imunocompetentes, mas freqüentemente está associada a um estado de comprometimento imunológico. Atualmente a etiologia desta micose é atribuída a três espécies: *Cryptococcus neoformans*, *C. grubii* (isolados no solo rico em fezes de pombos), e *C. gattii* (isolado nos eucaliptos). A via mais freqüente de contaminação é a inalatória, com posterior colonização do trato respiratório superior, podendo atingir aos alvéolos e desenvolver a sintomatologia respiratória, ou ocorrer disseminação hematogena com possível comprometimento do Sistema Nervoso Central. É notável o aumento na procura de animais de companhia nos grandes centros urbanos e, também, se verifica uma significativa população de pombos nas cidades, alojados em igrejas, prédios, parques e praças. A exposição dos cães a locais possivelmente contaminados e a saúde destes animais constitui-se uma preocupação e, visto que existem relatos na literatura, ainda que poucos, sobre a criptococose em cães, realizamos uma pesquisa sobre a presença da levedura nesta espécie. Este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência do *Cryptococcus* em cães com sintomatologia respiratória e/ou neurológica, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizado na cidade de Porto Alegre, Brasil. A amostragem foi composta por 112 cães. Realizou-se o exame direto, com nigrosina, do líquido cefalorraquidiano (n=17); o cultivo da secreção nasal (112), do sangue total (112) e do líquido cefalorraquidiano (n=17) em ágar níger (*Guizotia abyssynica*), com incubação a 37°C durante dez dias; e o teste de aglutinação em látex, utilizando-se o teste Crypto-LA (Wampole), com o soro (n=112) e o líquido cefalorraquidiano (n=17). Para o teste de aglutinação em látex foi realizado, também, tratamento com Pronase em 32 (28,57%) amostras de soro e 4 (23,52%) amostras de líquido cefalorraquidiano. Os resultados do exame direto, do cultivo e do teste de aglutinação em látex foram negativos para o *Cryptococcus* em todas as amostras testadas. Não se excluiu a possibilidade de ter ocorrido resultados falsos negativos, por não ter sido realizado um lavado nasal para coleta de material para cultivo e, também, porque o *Cryptococcus* poderia estar presente em pequenas quantidades no organismo e/ou ser pouco capsulado e, portanto, não sendo detectado através do teste de aglutinação em látex. Apesar dos resultados desta amostragem, é plausível a suposição que deva existir a ocorrência da infecção pelo *Cryptococcus*, embora haja a falta de uma suspeita clínica desta enfermidade, posto que, na região de abrangência do estudo existe uma população canina constantemente exposta ao risco por coabitarem com uma grande população de pombos.



## ABSTRACT

## SCREENING FOR CRYPTOCOCCOSIS IN DOGS REFERRED TO THE HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS UFRGS, PORTO ALEGRE, BRAZIL.

*Cryptococcosis is a mycose that infects man and in many animals, frequently is associated with imunodeficiency. The etiology of this micoses currently is attributed to C. neoformans, C. grubii (both isolated from soil with pigeons droppings) e C. gattii (associated with debris under the canopies of Eucalyptus camaldulensis). The most frequent route of contamination is by inhalation with subsequent colonization of the superior respiratory tract. The yeast can reach the alveoli and develop respiratory sintomatology or can be disseminated by haematogen route, with possible compromising of the Central Nervous System. It is notable the increase of pets in the great urban centers and of the populations of pigeons harbored at churches, buildings, parks and squares. Dogs are constantly exposed to contaminated places and the health of these animals constitutes a cause to concern. Based on this information and due the existence of few scientific papers about canine cryptococcosis, we accomplished a research about the presence of Cryptococcus in dogs. This work had as objective verify the occurrence of the Cryptococcus in dogs with respiratory and/or neurological signs assisted at the Veterinary Medical Teaching Hospital of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), at Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. The sampling was composed by 112 animals. Microscopic direct examinations of cerebrospinal fluid samples were carried out with nigrosine (17). Nasal secretion (112), total blood (112) and cerebrospinal fluid (17) were cultivated in bird seed agar plates (Guizotia abyssinica), and incubated at 37°C for up to ten days. The latex cryptococcal antigen agglutination test (Crypto-LA; Wampole) was performed on serum (112) and cerebrospinal fluid samples (17). Also, a previous treatment with Pronase in 32 (28,57%) serum samples and 4 (23,52%) samples of cerebrospinal fluid was made for the agglutination test. The results of the direct exam, culture and agglutination test in latex were negative for the Cryptococcus in all samples tested. The possibility of false negative results can not be excluded, because a nasal washed for material collection to cultivation was not made and also because the Cryptococcus could be present in small amounts in the organism and/or be less capsulated and, therefore, not be detected through the latex agglutination test. In spite of the results of this sampling, it is possible the suposition that the occurrence of the Cryptococcus infection should exist, although there is the lack of clinical diagnostic for this illness, considering that, in the study area of this sampling, the canine population are constantly exposed to the risk cohabiting with a great population of pigeons.*

## 1 INTRODUÇÃO

*Cryptococcus* é uma levedura capsulada, sapróbia e ubíqua, agente etiológico da criptococose, outrora denominada também de torulose, blastomicose europeia ou granulomatose criptocócica. O nome do gênero deriva da palavra grega *Kryptós*, que significa “secreto”, “escondido” ou ainda, designa relação com uma cripta, pelo fato deste organismo apresentar-se revestido por uma cápsula (PACIORNIK, 1978; BULMER, 1979; KREEGER-VAN RIJ, 1984 apud LARSSON, 2000).

A criptococose pode ocorrer em indivíduos imunocompetentes (CHRISTIANSON; ENGBER; ANDES, 2003), mas está comumente associada a um estado de comprometimento imunológico (RICHARDSON; WARNOCK, 1993). O *Cryptococcus* pode ser considerado o fungo mais patogênico em pacientes com imunodeficiência (FRANZOT et al., 1998; MARQUES et al., 2000). A doença pode ser aguda, subaguda ou crônica e envolver o cérebro, o pulmão, os ossos ou a pele. Não está comprovada a transmissão da doença do animal para o ser humano (EHRENSING; SAAG, 2001).

Nos animais, a criptococose é mais comum em gatos e em cães, e frequentemente acomete o sistema respiratório, neurológico, cutâneo e ocular (FRASER et al., 1997).

Os cães geralmente apresentam sinais clínicos neurológicos e/ou oftálmicos. O trato respiratório superior também é frequentemente envolvido. Ocasionalmente verifica-se úlcera cutânea, especialmente no nariz, nos lábios, na cavidade oral ou ao redor das unhas (MEDLEAU; HNLICA, 2003). Outros órgãos afetados em menor proporção são os rins, linfonodos, baço, fígado, tireóide, adrenal, pâncreas, ossos, trato gastrointestinal, músculo, próstata, miocárdio, e válvulas cardíacas (MEDLEAU; BARSANTI, 1990).

Os pequenos animais, principalmente os cães, estão tendo destaque na vida do ser humano e, muitas vezes, são tratados como parte da família. Existe uma crescente preocupação com a saúde e o bem estar destes animais. Visto que existem relatos na literatura, ainda que poucos, sobre a criptococose canina, realizamos uma pesquisa sobre a presença da levedura em cães atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O objetivo deste trabalho foi verificar uma possível relação entre cães com sinais clínicos respiratórios e/ou neurológicos, e a presença do *Cryptococcus* pesquisada através do exame direto com nigrosina (líquido cefalorraquidiano), do cultivo em ágar níger (*Guizotia abyssynica*) (secreção nasal, sangue total e líquido cefalorraquidiano) e do teste de Aglutinação em Látex (soro e líquido cefalorraquidiano).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico

O primeiro relato da levedura na natureza ocorreu em 1894, pelo italiano Sanfelice que a isolou a partir de suco de pêsego e a denominou *Saccharomyces neoformans* (EHRENSING; SAAG; 2001). No ano seguinte, ele demonstrou o efeito patogênico da levedura em animais experimentais (SANFELICE, 1895 apud CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Em 1950, Benham finalmente deu ao fungo o nome *Cryptococcus neoformans* (EHRENSING; SAAG, 2001). No mesmo ano, Evans identificou três sorotipos: A, B e C, e um quarto sorotipo, D, foi descrito vinte anos mais tarde por Wilson e Bennet, de acordo com as diferenças antigênicas dos polissacarídeos capsulares (DROUHET, 1996).

No Instituto Pasteur, em 1950, Drouhet, Segretain e Aubert identificaram a glucoronoxilomanana (GXM) como componente capsular, relacionando-a como sendo um fator de virulência. Drouhet e Segretain (1951) demonstraram que a GXM inibia a migração de leucócitos e a fagocitose (apud DROUHET, 1996).

Em 1951, Emmons relatou, pela primeira vez, a fonte de infecção, afirmando a presença da levedura no solo. Em 1955 detectou cepas virulentas do *Cryptococcus neoformans* em excretas e ninhos de pombos, e observou o tipo pneumônico grave da criptococose em trabalhadores que demoliam prédios velhos onde, no passado, havia pombos (EHRENSING; SAAG, 2001).

A partir de 1960, segundo Drouhet (1996), esta micose oportunista foi observada com maior frequência devido às terapias imunossupressoras.

Kwon-Chung, em 1975, propôs o gênero *Filobasidiella* para a fase sexual, com a espécie *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* sendo descrita como estágio teleomorfo do *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* sorotipos A e D, e *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* correspondendo ao estágio teleomorfo do *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* sorotipos B e C (DROUHET, 1996).

Ao final da década de 70, a incidência de criptococose aumentava rapidamente, com muitos casos sendo relacionados a terapias imunossupressoras para neoplasias, desordens autoimunes e transplantes de órgãos. Com a finalidade de chamar atenção para a gravidade da doença, Kaufman e Blumer (1978) utilizaram, então, o termo “um gigante acordando” para definir a importância da criptococose entre as micoses sistêmicas.

## 2.2 Características Gerais da Levedura *Cryptococcus*

As colônias de *Cryptococcus* são cremosas ou gomosas, de consistência mole, lisa, de cor branca, canela ou marrom, de crescimento rápido. As células são globosas, isoladas ou em pares, capsuladas, com parede grossa, podendo apresentar brotamento (MINAMI, 2003).

Os principais polissacarídeos que compõem a cápsula são glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e manoproteína (MP), sendo que o primeiro constituinte representa cerca de 88% da cápsula (VECCHIARELLI, 2000). Diferenças na estrutura da GXM produzem diferenças antigênicas que provêm as bases para a classificação em sorotipos A, B, C e D (CHERNIAK; SUNDSTROM, 1994; DAVIES; TROY, 1996). Devido a algumas amostras apresentarem características de ambos sorotipos A e D, constituiu-se o sorotipo AD (IKEDA et al., 1985).

Os sorotipos A e D compõem a variedade *neoformans* e os sorotipos B e C, a variedade *gattii* (TANAKA et al., 1994). Recentemente uma nova nomenclatura tem sido sugerida devido a diferenças moleculares, *C. neoformans* var. *grubii* (sinônimo: *C. n.* var. *neoformans* sorotipo A) (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999), *C. neoformans* var. *neoformans* (sinônimo: *C. n.* var. *neoformans* sorotipo D) e *C. gattii* (sinônimo: *C. n.* var. *gattii*) (KWON-CHUNG et al., 2002 apud O'BRIEN et al., 2004).

Os principais fatores de virulência do *Cryptococcus* são a formação de polissacarídeos capsulares (CHANG; KNOW-CHUNG, 1994), a síntese de melanina (ZHU et al., 2001; IKEDA. et al., 2002), a capacidade de crescimento a uma temperatura de 37<sup>0</sup> C

(ODOM et al., 1997 apud ZHU et al., 2001) e a produção de fosfolipase B (HIMMELREICH et al., 2003).

A cápsula é essencial para a patogenicidade do fungo por inibir a função plasmocítica, a fagocitose, a migração leucocítica e o sistema complemento (SHERDING, 1998).

Segundo Vecchiarelli (2000) e Clemons et al. (2000) a GXM gera um sinal negativo na ativação de células T e na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório.

Chiapello et al. (2003), demonstraram que a GXM do *Cryptococcus* induz, *in vitro*, a apoptose de linfócitos de ratos normais, sugerindo ser esta uma propriedade imunomoduladora da cápsula.

A síntese de polímeros de melanina, na presença de substratos fenóis, é importante durante a patogênese do *Cryptococcus* (ROSAS et al., 2000; GARCÍA-RIVERA; CASADEVALL, 2001). Experimento realizado por Nosanchuk, Rosas e Casadevall (1998) demonstram que a melanina pode ser imunogênica.

Numerosas leveduras e fungos filamentosos são carregados por pássaros. Eles representam um reservatório em potencial de fungos patogênicos (THÉRAUD et al., 2003). O *Cryptococcus* não causa infecção sistêmica em aves provavelmente devido à elevada temperatura corpórea nestas espécies, que é em torno de 39<sup>0</sup> C, e nesta temperatura a levedura perde seu potencial patogênico (MALIK et al., 2003).

O ambiente natural de origem do *Cryptococcus neoformans* é constituído por locais com excretas de pombos e outros pássaros e pode permanecer viável por até dois anos quando associado a ambiente úmido e protegido da luz (RICHARDSON; WARNOCK, 1993). Montenegro e Paula (2000) isolaram *C. neoformans* e *C. gattii* em locais urbanos com uma alta densidade de pessoas circulando.

Conforme Montenegro e Paula (2000), o *C. neoformans* é mais frequentemente isolado de locais abrigados, os quais favorecem a dessecação da excreta, e como ele é altamente resistente, consegue sobreviver à competição com outras populações microbianas presente nas excretas de pombos.

O *Cryptococcus* pode também ser encontrado em ocos de árvores, não estando associado á uma espécie de árvore em particular, mas sim a um nicho de biodegradação

natural de madeira, fornecendo substrato para o crescimento da levedura (LAZÉRA et al., 1996; LÁZERA et al., 2000).

Machado, Amaral e Severo (1993) isolaram o *C. neoformans*, sorotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*) no centro de Porto Alegre, em prédio contendo acúmulo de fezes secas de pombos. Estudo realizado por Casali et al. (2001) demonstrou o predomínio de amostras de *Cryptococcus neoformans* sorotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*) em isolados clínicos e ambientais de amostras do Rio Grande do Sul.

O *Cryptococcus* entra no hospedeiro pela rota respiratória e pode se disseminar para outros locais, mas os fatores determinantes para a invasão deste fungo não estão bem definidos (KWON-CHUNG et al., 2000).

### 2.3 Criptococose nos animais

A criptococose tem sido amplamente citada como uma infecção importante, apresentando uma grande distribuição mundial e acometendo várias espécies de animais como bovinos, pequenos ruminantes (GARCIA; BLANCO, 2000), eqüinos (PETRITES-MURPHY et al., 1996), aves (MALIK et al., 2003), Coalas (KROCKENBERGER; CANFIELD; MALIK, 2003), répteis (McNAMARA et al., 1994 apud DROUHET, 1996), cães e gatos (MEDLEAU; BARSANTI, 1990).

Segundo Medleau e Barsanti (1990), apesar do *Cryptococcus* ser encontrado comumente na natureza, a incidência da doença, em animais, parece ser baixa, sugerindo que o organismo é oportunista.

O *Cryptococcus* é uma levedura que possui tropismo e seletiva capacidade de infectar o Sistema Nervoso Central (SNC) em animais (BARRON, 1955; ANANDI et al., 1991 apud CORRÊA, 1994).

A infecção se torna freqüentemente disseminada, e os sinais inespecíficos e variáveis dependem do envolvimento dos órgãos (FRASER, et al., 1997).

De acordo com Garcia e Blanco (2000), as mamites bovinas causadas pelo *Cryptococcus* são graves, já que além de produzir sintomas típicos deste processo, causa uma destruição total do tecido mamário, interrompendo a produção de leite. Em pequenos

ruminantes, a criptococose pode cursar com quadros pulmonares graves e ser confundido com outras patologias.

Segundo Medleau e Barsanti (1990), a criptococose é a micose sistêmica mais comum em felinos. Felinos com criptococose geralmente apresentam mais de um sistema afetado: respiratório, cutâneo, SNC e ocular, sendo que o primeiro é de maior ocorrência (MEDLEAU; BARSANTI, 1990).

Beatty et al. (2000) relataram três casos de doença vestibular associada à criptococose em felinos. Foster et al. (2001) descreveram um caso de granuloma criptocócico cerebral em felino.

Davies e Troy (1996) encontraram 263 casos de criptococose felina de um total de 571 animais com infecção micótica, sendo que 63% dos animais apresentavam descarga nasal e somente 8% apresentavam sinais neurológicos. Foram detectados 12% de animais soropositivos para o vírus da imunodeficiência felina (FIV), 8% soropositivos para o vírus da leucemia felina (FeLV) e 2% soropositivos para o vírus da peritonite infecciosa felina (FIP).

No estudo realizado por Malik et al. (1992), avaliando vinte e nove casos de criptococose em gatos, foi observada uma maior manifestação da doença envolvendo a cavidade nasal. A rinite micótica foi observada em 83% dos casos. Sinais cutâneos e subcutâneos foram evidentes em 52% dos mesmos. Sinais neurológicos foram notados em apenas um animal. Anticorpos contra FIV foram detectados em 28% dos casos.

O primeiro caso de criptococose em gato doméstico, no Brasil, foi descrito por Chagas et al. em 1971 (apud CORRÊA, 1994). Chiesa (1998), realizando um estudo sobre a criptococose felina no Brasil, encontrou uma porcentagem de 8% de soropositivos à presença do antígeno capsular criptocócico em felinos com sinais clínicos sugestivos de criptococose e de 8% de soropositivos em felinos assintomáticos.

Em gatos, a infecção por FeLV e/ou FIV, pode ser um fator predisponente para o desenvolvimento da criptococose (MEDLEAU; BARSANTI, 1990; WILLEMSE, 1998). Ferreiro et al. (2001), relataram o primeiro caso de criptococose disseminada por *Cryptococcus gattii*, no Brasil, em um felino da raça siamês, positivo para FeLV.



## 2.4 Criptococose nos cães

Segundo Garcia e Blanco (2000), a criptococose canina apresenta quadros clínicos cuja incidência varia muito dependendo da área geográfica, sendo superior em climas mais quentes.

De acordo com Medleau e Barsanti (1990), a criptococose em cães ocorre mais freqüentemente em animais de raças de grande porte, em torno de 2 a 8 anos de idade, sem predisposição quanto ao sexo.

Segundo o estudo realizado por Malik et al. (1995), a idade de maior ocorrência da doença é de 4 anos ou menos e as raças mais atingidas são Doberman, Dogue Alemão e Pastor Alemão. Já para Tilley e Smith Jr. (2003), as raças mais atingidas são Cocker, Doberman e Labrador.

De acordo com O'Brien et al. (2004), raças de grande porte apresentam um risco maior de desenvolver a criptococose se comparados com raças pequenas. Isto se deve, provavelmente, ao fato destas raças permanecerem por um tempo maior fora de casa e, portanto, estando mais expostos a inalação de propágulos fúngicos.

Ao contrário dos gatos, a doença nasal clinicamente evidente é rara nos cães com criptococose (SHERDING, 1998). A infecção pode se estender caudalmente pelos endoturbinados causando meningoencefalite, neurite óptica e/ou rinite (MALIK; JACOBS; LOVE, 2001 apud O'BRIEN, 2004).

Os órgãos mais atingidos nos cães são o SNC e os olhos. As lesões são geralmente de meningoencefalite, envolvimento dos nervos óptico, facial ou vestibular e corioretinite granulomatosa. Os sinais de alteração do SNC mais comumente encontrados são inclinação da cabeça, nistagmo, paralisia facial, paresia, paraplegia, tetraplegia, ataxia, andar em círculo, agressividade e dor cervical. As anormalidades oculares incluem corioretinite, cegueira, dilatação pupilar e uveíte (MEDLEAU; BARSANTI, 1990; TILLEY; SMITH JR., 2003).

Malik et al. (1995) observou a tendência da criptococose envolver estruturas adjacentes e contínuas à cavidade nasal, sugerindo que a rinite micótica parece ser a principal alteração encontrada em cães.

Para Medleau e Barsanti (1990), aproximadamente 50% dos cães apresentam lesões no trato respiratório, geralmente nos pulmões. Uma pequena proporção apresenta lesão na cavidade nasal e raramente ocorre envolvimento dos sinus nasais. Outros órgãos afetados em menor proporção são os rins, nódulos linfáticos, baço, fígado, tireóide, adrenal, pâncreas, ossos, trato gastrintestinal, músculo, miocárdio, próstata, válvulas cardíacas e tonsilas.

Acosta et al. (1999) relatou um caso de linfadenite canina por *Cryptococcus neoformans* em um animal da raça Great Danes.

Malik et al. (1997) realizaram um estudo sobre a presença do *Cryptococcus neoformans* na cavidade nasal de cães e gatos assintomáticos. Encontrou-se uma positividade de 14% para cães e de 7% para gatos quanto ao cultivo do lavado nasal e todos foram não reagentes ao teste de aglutinação em látex.

Segundo Medleau e Barsanti (1990), em cães, doenças imunossupressoras, como erlichiose, podem estar associadas com a criptococose fatal.

Honsho et al (2003) relatou um caso de criptococose sistêmica atingindo o trato digestivo, SNC, olhos, rins, pâncreas e linfonodos em um cão que havia recebido antibióticos e corticosteróide em doses imunossupressivas.

Malik et al. (1995) realizando um estudo retrospectivo de 20 casos de criptococose em cães não constatou relação entre prováveis causas de imunodeficiências com o desenvolvimento desta micose.

De acordo com O'Brien et al. (2004), o *Cryptococcus* parece ser mais um patógeno primário do que um agente oportunista em cães e gatos, mas é notável que fatores imunossupressivos contribuem para o curso da infecção.

## **2.5 Diagnóstico**

O diagnóstico laboratorial da criptococose é baseado em três fundamentos: a demonstração do fungo no material clínico, o isolamento em cultura e a identificação final, e pela pesquisa de antígenos circulantes (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

A inoculação experimental e as provas bioquímicas também contribuem para o diagnóstico (MINAMI, 2003).

### 2.5.1 Exame Direto

O exame direto do material clínico pode ser realizado a partir do o escarro, secreção nasal, urina e outros em preparação com nigrosina ou tinta da Índia (RICHARDSON; WARNOCK, 1993). Após uma colheita adequada do material clínico, este deve se processado de imediato para a demonstração de estruturas fúngicas características do *Cryptococcus* no material (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

### 2.5.2 Cultivo

Em 1962, Staib (apud DROUHET, 1997) reportou o desenvolvimento de colônias de *Cryptococcus neoformans* de coloração marrom, quando cultivados em ágar contendo sementes de níger (*Guizotia abyssinica*). A levedura cresce formando colônias pigmentadas, produzindo melanina através da enzima fenoxidase (EHRENSING; SAAG, 2001; SAUBOLLE, 2001).

O fungo pode ser facilmente obtido a partir de cultivos do líquido cefalorraquidiano, sangue, urina, escarro, pus, aspirado de medula óssea e fragmentos de tecidos (SEVERO, 1991). O sangue pode ser coletado sem anticoagulante e ser semeado diretamente no meio de cultivo (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Para o cultivo do *C. neoformans* também pode se utilizar o ágar sabouraud ou o ágar malte, sem ou com cloranfenicol (MINAMI, 2003).

De acordo com Severo (1991) ocorre o crescimento em cultura num período de 2 a 5 dias. A utilização de ciclohexamida nos meios de cultivo e a incubação em temperaturas superiores a 37<sup>0</sup> C impedem o crescimento desta levedura.

### 2.5.3 Teste de Aglutinação em Látex

A detecção do antígeno polissacarídeo capsular do *Cryptococcus neoformans* nos fluidos corporais pelo método de aglutinação em látex foi descrito por Bloomfield et al. em 1963 (apud WU; KOO, 1983) e constitui um método sensível e específico para o rápido diagnóstico de criptococose (KAUFFMAN et al., 1981; ROESCH et al., 1995; TANAKA et al., 1994).

Para Richardson e Warnock (1993) o teste de aglutinação em látex, pode ser considerado como sendo o método mais utilizado para o diagnóstico desta micose.

Medleau et al. (1990) realizaram um estudo de avaliação do teste de aglutinação em látex, com o teste comercial da marca Calas, para o diagnóstico de criptococose em gatos, obtendo uma sensibilidade de 95% e especificidade de 100%. Em outro estudo, o teste de aglutinação em látex foi utilizado na monitoração do desenvolvimento de criptococose em felinos infectados experimentalmente (MEDLEAU; GREENE; RAKICH, 1990).

Malik et al. (1996) utilizaram o teste de aglutinação em látex para o diagnóstico e monitoramento da terapia para criptococose em 58 animais.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem

A amostragem estudada foi composta por 112 cães (n=59;53% fêmeas e n=53;47% machos) atendidos na rotina do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de outubro de 2003 a maio de 2004. Os animais foram divididos em três grupos de acordo com a sintomatologia apresentada: respiratória, neurológica e com ambas as sintomatologias.

O grupo de animais com sinais clínicos respiratórios (n=53;47%) foi composto, principalmente, por cães atendidos no setor de doenças infectocontagiosas, apresentando, em sua maioria, secreção nasal mucopurulenta, tosse, espirros e/ou alterações na ausculta torácica.

O grupo de animais com sinais clínicos neurológicos (n=38;34%) foi composto por cães atendidos no setor de neurologia e que foram encaminhados para o exame de mielografia, apresentando, em sua maioria, ataxia e paresia.

O grupo de animais com sinais clínicos respiratórios e neurológicos (n=21;19%) foi composto por cães atendidos no setor de doenças infectocontagiosas, apresentando, em sua maioria, secreção nasal mucopurulenta, alteração na ausculta torácica, mioclonias, vocalização e/ou convulsão.

Os animais da amostragem não apresentaram alterações cutâneas e oculares significativas, não sendo, portanto, classificados por estes sistemas.

A amostragem, quanto à raça dos animais, foi composta por 51 (45,53%) cães sem raça definida (SRD); 17 (15,17%) Dachshund; 9 (8,03%) Fila Brasileiro; 7 (6,25%) Poodle e Rottweiler; 5 (4,46%) Pastor Alemão; 4 (3,57%) Cocker; 2 (1,78%), Boxer, Husky, Labrador e Pit Bull; 1 (0,89%), Akita, Collie, Pinscher e Weimaraner.

A Figura 1 representa o perfil dos animais que foram selecionados para a coleta de material e incluídos no grupo de animais com sintomatologia respiratória.



Figura 1: Cão, selecionado para amostragem do grupo de animais com sintomatologia respiratória, apresentando abundante secreção nasal purulenta.

## **3.2 Coleta das Amostras**

### **3.2.1 Secreção Nasal**

Foram utilizadas 112 amostras de secreção nasal. Para a obtenção do material foram utilizados escovas interdentais finas, e eppendorfs contendo 1ml de água destilada, ambos autoclavados. A escova interdental era mergulhada em água destilada e posteriormente se fazia uma fricção no interior das narinas dos cães.

### 3.2.2 Sangue total

Foram utilizadas 112 amostras de sangue total. Para o procedimento de coleta, era realizada a antissepsia com álcool iodado e puncionado sangue da veia jugular.

### 3.2.3 Soro

Foram utilizadas 112 amostras de soro. Para o procedimento de coleta, era realizada a antissepsia com álcool iodado, puncionado aproximadamente 3 ml de sangue da veia jugular. O sangue era acondicionado em frasco sem anticoagulante, a 25°C por 30 minutos, para a formação do coágulo, e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante era armazenado em tubos eppendorfs estéreis.

### 3.2.4 Líquido Cefalorraquidiano

Foram utilizadas 17 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR). Para o procedimento de coleta era realizada a tricotomia da região lombar e antissepsia com álcool iodado. O paciente, anestesiado, era posicionado em decúbito lateral esquerdo e a agulha de coleta era inserida no espaço intercostal entre L5-L6 ou L6-L7. O LRC era coletado por pressão e não por aspiração, por este fato foram obtidos somente 17 amostras do total de 38 animais. O LCR era acondicionado em tubos eppendorfs estéreis e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante era armazenado em tubos eppendorfs estéreis.

### **3.3 Processamento das amostras**

#### **3.3.1 Exame Direto**

As amostras de LCR (n=17) foram examinadas entre lâmina-lamínula com nigrosina em objetiva de 40X.

#### **3.3.2 Cultivo**

As amostras de secreção nasal (n=112), de sangue total (n=112) e de LCR (n=17) foram semeadas em placas de ágar níger (*Guizotia abyssinica*) (Apêndice A) e incubadas a 37°C por dez dias.

#### **3.3.3 Aglutinação em Látex**

As amostras de soro (n=112) e de LCR (n=17) foram inativadas a 56°C por 30 minutos, e refrigeradas a 4<sup>o</sup> C por até 24 horas. O teste de Aglutinação em Látex foi realizado, utilizando-se o Crypto-LA (Wampole Laboratories, Cranbury, N.J.), conforme protocolo sugerido pelo manual (Apêndice B).

Do total de 112 amostras de soro, 32 (n=28;57%), escolhidas aleatoriamente, foram testadas sem e com tratamento prévio com pronase.

Do total de 17 amostras de LCR, 4 (n=23;52%), escolhidas aleatoriamente, foram testadas sem e com tratamento com pronase.



No tratamento com pronase, foram utilizados 300µl da amostra e adicionado 50µl da enzima, sendo colocadas em banho-maria a 56°C por 30 minutos e, após, adicionado 50µl do inibidor da pronase.

### **3.3.3.1** Protocolo Qualitativo do Crypto-LA Teste

Para a realização do teste de aglutinação em látex era pipetado 50µl do soro e/ou LCR a ser testado, nas câmaras A e B. Após, adicionado 50µl do reagente látex na câmara A e 50µl do controle látex na câmara B. A amostra era homogeneizada colocando-se a placa no rotator a 160 rpm por 10 minutos. Após este procedimento observava-se se ocorria reação de aglutinação.

### **3.3.3.2** Interpretação do Resultado Qualitativo

O teste era considerado não reagente quando a amostra estiva homogênea, com aspecto leitoso, com ausência de aglutinação. Para se considerado reagente deveria ocorrer reação de aglutinação.

Ao obter um exame direto e/ou uma cultura positiva, o soro e/ou o líquido cefalorraquidiano do animal seria testado com outro kit, além do Crypto-LA (Wampole), para a confirmação da positividade. Porém não ocorreu nenhuma amostra positiva de exame direto e cultivo.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Exame Direto**

Não se verificou a presença da levedura em nenhuma das 17 amostras de líquido cefalorraquidiano ao exame direto com nigrosina.

### **4.2 Isolamento em Cultivo**

Não ocorreu o crescimento do *Cryptococcus neoformans* no cultivo em ágar níger a 37 °C, por dez dias em nenhuma das 112 amostras de secreção nasal, em nenhuma das 112 amostras de sangue total e, também, em nenhuma das 17 amostras de líquido cefalorraquidiano.

### **4.3 Aglutinação em Látex**

Não ocorreu reação de aglutinação em látex em nenhuma das 112 amostras de soro e, também, em nenhuma das 17 amostras de líquido cefalorraquidiano. Não ocorreu alteração nos resultados nas amostras tratadas com pronase.

Do total de 112 animais, foram entrevistados os proprietários de 59 cães para traçar um perfil do ambiente onde estes viviam. Os potenciais de exposição da população amostrada a situações de risco de contrair a infecção, através de ambientes possivelmente contaminados, estão sumarizados na Tabela 1. Os animais foram classificados quanto a

presença ou ausência de contato com excretas de pássaros em geral, com excretas de pombos e quanto a acesso a parques ou não.

Tabela 1 – Situação de exposição de 59 cães (atendidos no HCV - UFRGS, no período de 2003/2004) a ambientes possivelmente contaminados com propágulos fúngicos de *Cryptococcus*.

<b>Contato</b>	<b>Excreta de Pássaros em geral N (%)</b>	<b>Excreta de Pombos N (%)</b>	<b>Acesso a Parques N (%)</b>
Presente	47 (79,66)	40 (67,80)	32 (54,24)
Ausente	12 (20,34)	19 (32,20)	27 (45,76)
<b>TOTAL</b>	<b>59</b>	<b>59</b>	<b>59</b>

Do total de 47 animais em contato com excretas de pássaros em geral, 34 (72,34%) eram SRD; 4 (8,51%) Pastor Alemão; 3 (6,38%) Dachshund; 2 (4,25%) Cocker; 1 (2,12%) Akita, Collie, Fila e Husky.

Do total de 40 animais em contato com excreta de pombos, 30 (75%) eram SRD; 2 (5%) Cocker, Dachshund e Pastor Alemão; 1(2,5%) Collie, Fila, Poodle e Rottweiler.

Do total de 32 animais que tinham acesso a parques, 28 (87,5%) eram SRD, 2 (6,25%) Dachshund; 1 (3,12%) Fila, Rottweiler.

## 5 DISCUSSÃO

A criptococose foi considerada por Ajello, em 1970, um “sleeping giant” dentre as micoses sistêmicas. Esta levedurose se tornou em poucos anos, segundo Kaufman e Blumer (1978), um gigante desperto, provavelmente devido a tratamentos imunossupressores intensivos em pacientes transplantados ou acometidos por leucemia. Com a pandemia da AIDS, a ocorrência e severidade da criptococose aumentaram consideravelmente e com isso aumentou também os estudos sobre esta micose.

Apesar de haver poucos relatos de criptococose canina, na literatura, acredita-se que o diagnóstico desta micose está sendo deficiente, visto que o *Cryptococcus* é uma levedura ubiqüitária e, também, porque os cães estão freqüentemente em contato direto com o habitat natural da levedura.

A amostragem testada para a presença da levedura foi composta, principalmente, por cães de população carente, que vivem em casas e sítios na periferia de Porto Alegre. A grande maioria destes animais estava constantemente exposta ao risco de infecção por coabitarem com uma grande população de pássaros e conseqüentemente com seus dejetos, sendo que oito proprietários relataram que haviam pombos no comedouro de seus cães e dois, moradores em prédios, referiram a presença destas aves pousando em suas janelas e ar condicionado.

O'Brien et al. (2004), ao realizarem um estudo retrospectivo de 40 cães com criptococose, verificaram que de 38 animais, 63% residiam em áreas suburbanas (com jardins, parques e árvores), 32% em áreas rurais (longe da área metropolitana), e somente 5% em áreas urbanas (grande densidade populacional, sem jardins e parques). Pelos resultados obtidos no presente experimento, não se verificou uma relação entre o grau de exposição a ambientes favoráveis a presença da levedura e a ocorrência de criptococose nestes animais.

As amostras foram coletadas de outubro de 2003 a maio de 2004 e estes meses são caracterizados por apresentarem altas temperaturas na região de abrangência do estudo. Théraud et al. (2003) verificaram que altas temperaturas (30<sup>0</sup> C) são menos favoráveis para

a sobrevivência do *Cryptococcus*. É necessário, portanto, verificar se há influências sazonais na ocorrência desta micose.

Malik et al. (1997), ao testar uma população assintomática composta por 56 cães alojados em um abrigo para animais abandonados, encontraram 14% de positividade no cultivo do lavado nasal. No presente estudo, o *Cryptococcus* não foi isolado em nenhuma das amostras cultivadas a partir do líquido cefalorraquidiano, do sangue total e da secreção nasal. A diferença dos resultados obtidos pode estar relacionada às diferenças nas populações estudadas, já que no estudo realizado pelo autor foram testados animais provenientes de um mesmo local, onde poderia haver um foco infeccioso.

Não se exclui, neste experimento, a possibilidade de ter ocorrido resultados falsos negativos no cultivo, pois não foi realizado um lavado nasal para coleta de material. Este procedimento seria ideal para a obtenção de uma amostra, porém não foi realizado pela necessidade destes animais estarem anestesiados no momento da coleta.

De acordo com Saubolle (2001), a detecção do antígeno criptocócico é útil quando positivo, mas não é fidedigno para o diagnóstico de infecção limitada ao trato respiratório, e para Richardson e Warnock (1993), resultados falsos negativos na aglutinação em látex podem ocorrer se a levedura está presente em pequenas quantidades ou se o organismo não é bem capsulado. Por este fato, não se excluí, neste experimento, a possibilidade de ter ocorrido resultados falsos negativos na prova de aglutinação em látex.

Também para Tintelnot et al. (1999), não se deve excluir a criptococose disseminada em todos os casos em que o teste de aglutinação em látex seja negativo. Tintelnot et al. (2000) relataram casos de criptococose disseminada em humanos sem a detecção de antígeno criptocócico, sendo realizado o diagnóstico através do cultivo. No presente experimento, todas as amostras foram negativas ao cultivo e teste de aglutinação em látex.

Resultados falsos positivos na aglutinação em látex podem ocorrer na presença de certas macroglobulinas que, normalmente, ocorrem no soro de humanos com artrite reumatóide, sarcoidose, cirrose, sífilis, psoríases, e lúpus eritematoso sistêmico. (BENNETT; BAILEY, 1971; SINGER, 1961 apud MEDLEAU et al., 1990). A aglutinação não específica é detectada pelo uso de globulina normal reagente. Segundo Medleau et al. (1990), a aglutinação em globulina normal reagente e em globulina anticriptocócica

reagente requer diluição com ambos os reagentes. Neste experimento, todas as amostras foram testadas com globulina normal reagente, não ocorrendo reação de aglutinação em nenhuma amostra.

Gray e Roberts (1988), avaliaram o uso da Pronase para eliminar fatores de interferência na aglutinação em látex, como reações cruzadas, e verificaram que ocorreu o aumento na sensibilidade do teste.

De acordo com Stockman e Roberts (1983, apud MALIK et al., 1996) a pronase degrada anticorpos e proteínas que se ligam e mascaram o antígeno, com subsequente liberação dos polissacarídeos resultando em altos títulos na aglutinação. O kit utilizado no experimento, Crypto-LA (Wampole Laboratories, Cranbury, N.J), não contém esta enzima. Foram testadas 32 (28,57%) amostras de soro e 4 (23,52%) amostras de líquido cefalorraquidiano, com e sem tratamento prévio com pronase. Não se verificou alteração nos resultados destas amostras, sendo todas negativas para o teste de aglutinação em látex. Seria ideal testar todas as amostras com tratamento prévio com pronase.

Para Tilley e Smith Jr. (2003), a causa de ocorrência de criptococose seria a exposição a organismos criptocócicos e a incapacidade do sistema imune de evitar a colonização e a invasão nos tecidos. De acordo com Swenson e Reece (1993), a limpeza do trato respiratório superior é dependente do movimento de uma camada de fluido mucinoso, proporcionado pela atividade ciliar da camada de epitélio colunar na membrana mucosa traqueobrônquica.

Segundo Gross et al. (1997), em indivíduos imunocompetentes, os macrófagos alveolares, provavelmente, preveniriam a disseminação do *C. neoformans* para os pulmões. De acordo com Swenson e Reece (1993) a atividade fagocítica é considerada como o processo mais importante para a limpeza das partículas e dos microorganismos inalados.

A amostra testada foi composta por animais que apresentavam sinais clínicos de alteração respiratória e/ou neurológica e que poderiam estar com seu sistema imunológico deficiente. A maioria dos cães era criada solta nos pátios de suas casas, entrando em contato direto com locais onde provavelmente haveriam propágulos do *Cryptococcus neoformans* e, por conseqüência, poderiam estar mais predispostos à infecção. De acordo com Kwon-Chung et al. (2000), sabe-se que a rota de contaminação é a inalação da

levedura, com posterior disseminação para outros tecidos, mas o mecanismo utilizado pela levedura ainda é pouco compreendido.

Uma possível explicação para os resultados obtidos e até mesmo para o fato de que os cães são menos predispostos a esta micose em relação aos gatos poderia ser a diferença na temperatura destes animais. De acordo com Swenson e Reece (1993) a temperatura retal média, que é um indicador da temperatura corporal profunda, é de 38,6<sup>o</sup>C (variação de 38,1 - 39,2<sup>o</sup>C) para gatos e de 38,9<sup>o</sup>C (variação de 37,9 - 39,9<sup>o</sup>C) para cães. A temperatura retal do cão tende a aumentar a uma temperatura ambiente de 27 – 30<sup>o</sup>C, enquanto que o gato tem sua temperatura retal aumentada a uma temperatura ambiente de 32<sup>o</sup>C. Ao “fuçar” a terra, os cães estão muito mais expostos ao contato com a levedura mas, ao mesmo tempo, o fato de o cão apresentar uma temperatura mais elevada do que o gato e ser mais suscetível às variações ambientais, além de ter um comportamento mais ativo, pode dificultar uma infecção pelo *Cryptococcus*, visto que a levedura pode não suportar temperaturas tão elevadas.

Muitos aspectos sobre a patogenia do *Cryptococcus* ainda não estão bem esclarecidos, incluindo o mecanismo de defesa que previne a passagem do estágio da colonização para o da disseminação (FELDMESSER; TUCKER; CASADEVALL, 2001). Segundo Ikeda, Tamura e Shinoda (2000) deve haver mais infecções subclínicas que o esperado em cães e gatos.

Sabe-se que a criptococose tem uma ocorrência menor nos cães, em relação aos gatos (MEDLEAU; BARSANTI, 1990; MALIK et al., 1995). É notável o aumento na procura de animais de companhia nos grandes centros urbanos. Os pequenos animais estão ganhando destaque na vida do ser humano, principalmente os cães, que são adquiridos, muitas vezes, por poder proporcionar um contato social entre as pessoas. Também se verifica uma significativa população de pombos nas cidades, alojados em igrejas, prédios, parques e praças. A exposição dos cães, que muitas vezes são parte da família, a locais possivelmente contaminados, constitui-se uma preocupação e por isso justifica-se a pesquisa nesta espécie.

Apesar dos resultados desta amostragem, é plausível a suposição que deva existir a ocorrência da infecção pelo *Cryptococcus*, embora haja a falta de uma suspeita clínica desta enfermidade, posto que, na região de abrangência do estudo, existe uma população canina

constantemente exposta ao risco por coabitarem com uma grande população de pombos, cujos dejetos estão disseminados em prédios, parques e praças.



## CONCLUSÃO

Neste trabalho, sob as condições utilizadas, não foi detectada relação entre cães com sinais clínicos respiratórios e/ou neurológicos e a presença *Cryptococcus*. Porém, este resultado não exclui a possibilidade da existência da infecção por *Cryptococcus*, já que a população canina analisada está constantemente exposta a esse risco por coabitarem com aves, principalmente pombos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJELLO, L. The medical mycological iceberg. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MYCOSES, 1970, Washington. **Scientific Publication**, n. 205, Washington, 1970, p. 3-12.

ACOSTA, B. et al. Linfadenitis canina por *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, p. 155-157, 1999.

BEATTY, J. A. et al. Peripheral vestibular disease associated with cryptococcosis in three cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 2, p. 29-34, 2000.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM, 1998. 541p.

CASALI, A. et al. *Cryptococcus neoformans* aspectos moleculares e epidemiológicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 20, p.34-37,2001.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p. 4912-4919, 1994.

CHERNIAK, R.; SUNDSTROM, J. B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 1507-1512, 1994.

CHIAPELLO, L. S. et al. Apoptosis induction by glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 41, p. 347-353, 2003.

CHIESA, S. C. **Criptococose felina: aspectos clínicos-epidemiológicos**.1998. 94 f. (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

CHRISTIANSON, J. C.; ENGBER, W.; ANDES, D. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. **Medical Mycology**, v. 41, p. 177-188, 2003.

CLEMONS, K. V. et al. Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. **Medical Mycology**, v. 38, p. 99-111, 2000.

CORRÊA, G. L. B. Criptococose em gatos: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, v. 24, n. 2, p. 431-437, 1994.

DAVIES, C.; TROY, G. C. Deep mycotic infections in cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, p. 380-391, 1996.

DROUHET, E. Milestones in the history of *Cryptococcus* and cryptococcosis. In: INTERNATIONAL CONFERENCE, 3. CRYPTOCOCCUS & CRYPTOCOCCOSIS. **Abstracts**, Paris: [s.n], 1996. p. 1-5.

DROUHET, E. Milestones in the history of *cryptococcus* and cryptococcosis. **Journal Mycology Médical.**, v. 7, p. 10-27, 1997.

EHRENSING, E. R.; SAAG, M. S. Criptococose. In: SAROSI, G. A.; DAVIES, S. F. **Doenças fúngicas do pulmão**. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. cap. 7, p.89-101.

FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 273-278, 2001.

FERREIRO, L. et al. Disseminated cryptococcosis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an immunocompromised siamese cat: a case report. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 3. 2001, Águas de Lindóia. **Anais**. Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Micologia, 2001. p. 129.

FRANZOT, S. P. et al. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 1, p. 89-97, 1998.

FRANZOT S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *C. neoformans* var. *grubii*: separate varietal status of *C. neoformans* serotypes A isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, p. 838-840, 1999.

FRASER, C. M. et al. Infecções fúngicas. In: MANUAL Merk de veterinária. 7. ed., São Paulo: Roca, 1997. p. 416-417.

FOSTER, S. F. et al. Cerebral cryptococcal granuloma in a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 3, p. 39-44, 2001.

GARCIA, M. E.; BLANCO, J. L. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. S2-S7, 2000.

GARCÍA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. **Medical Mycology**, v. 39, p. 353-357, 2001.

GRAY, L. D.; ROBERTS, G. D. Experience with the use of pronase to eliminate interference factors in the latex agglutination test for cryptococcal antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2450-2451, 1988.

GROSS, N. T. et al. Interaction between *Cryptococcus neoformans* and alveolar macrophages. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 35, p. 263-269, 1997.

- HIMMELREICH, U. et al. Identification of metabolites of importance in the pathogenesis of pulmonary cryptococcoma using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 285-290, 2003.
- HONSHO, C. S. et al. Generalized systemic cryptococcosis in a dog after immunosuppressive corticotherapy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n.2, 2003.
- IKEDA, R. et al. Chemical characterization of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. **Microbiology Immunology**. V. 29, p. 981-991, 1985.
- IKEDA, R. et al. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1214-1218, 2002.
- IKEDA, R.; TAMURA, M.; SHINODA, T. Persistence of cryptococcal antigenemia in a infected dog and uninfected rabbits. **Medical Mycology**, v. 38, p. 85-89, 2000.
- KAUFFMAN, C. A. et al. Detection of cryptococcal antigen. **American Society of Clinical Pathologists**, v. 75, n. 1, p. 106-109, 1981.
- KAUFMAN, L.; BLUMER, S. Cryptococcosis: the awakening giant. In: THE BLACK AND WHITE YEST, INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCOSES, 4. 1978. Washington. **Proceedings**. Washington: Pan American Health Organization Science Publishing 356, 1978. p. 176-184.
- KROCKENBERG, M. B.; CANFIELD, P. J.; MALIK, R. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): a review of 43 cases os cryptococcosis. **Medical Mycology**, v. 41, p. 225-234, 2003.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. Cryptococcosis: clinical and biological aspects. **Medical Mycology**, v. 38, sup. 1, p. 205-213, 2000.
- LARSSON, C. E. Criptococose felina aspectos clínico-epidemiológicos. In: SIMPOSIUM BRASILEIRO DE MICOLOGIA SOBRE MICOSES ANIMAIS, 2000, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Micologia, 2000. p. 72-77.
- LAZÉRA, M. S. et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 34, p. 127-131, 1996.
- LAZÉRA, M. S. et al. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, p. 379-383, 2000.
- MACHADO, C. C.; AMARAL, A. A.; SEVERO, L. C. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, p. 77-79, 1993.

- MALIK, R. et al. Cryptococcosis in cats: clinical and mycological assessment of 29 cases and evaluation of treatment using orally administered fluconazole. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, p. 133-144, 1992.
- MALIK, R. et al. Cryptococcosis in dogs: a retrospective study of 20 consecutive cases. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 33, p. 291-297, 1995.
- MALIK, R. et al. A latex cryptococcal antigen agglutination test for diagnosis and monitoring of therapy for cryptococcosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 74, p. 358-364, 1996.
- MALIK, R. et al. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 35, p. 27-31, 1997.
- MALIK, R. et al. Avian cryptococcosis. **Medical Mycology**, v. 41, p. 115-124, 2003.
- MARQUES, S. A. et al. Mycoses associated with AIDS in the third world. **Medical Mycology**, v. 38, sup. 1, p. 269-279, 2000.
- MEDLEAU, L. et al. Clinical evaluation of cryptococcal antigen latex agglutination test for diagnosis of cryptococcosis in cats. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 9, 1990.
- MEDLEAU, L.; BARSANTI, J. A. Cryptococcosis. In: GREENE, C.E. **Infections Disease of the dog and cat**, Philadelphia: Saunders, 1990. cap. 67, p. 687-695.
- MEDLEAU, L.; GREENE, C. E.; RAKICH, P. M. Evaluation of ketoconazole and itraconazole for treatment of disseminated cryptococcosis in cats. **American Journal Veterinary Research**, v. 51, p. 1454-1458, 1990.
- MEDLEAU, L.; HNLICA, K. A. Micose cutâneas. In: **Dermatologia de pequenos animais** : atlas colorido e guia terapêutico. 1. ed. São Paulo: Roca, 2003. cap. 3, p. 35-58.
- MINAMI, P. S. **Micologia métodos laboratoriais de diagnóstico das micoses**. São Paulo: Manole, 2003. 199 p.
- MONTENEGRO, H.; PAULA, C. R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. **Medical Mycology**, v. 38, p. 385-390, 2000.
- NOSANCHUK, J. D.; ROSAS, A. L.; CASADEVALL, A. The antibody response to fungal melanin in mice. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 6026-6030, 1998.
- O'BRIEN, C. R. et al. Retrospective study of feline and canine cryptococcosis in Australia from 1981 to 2001: 195 cases. **Medical Mycology**, v. 42, p. 449-460, 2004.

- PETRITES-MURPHY, M. et al. Equine cryptococcal endometritis and placentitis with neonatal cryptococcal pneumonia. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 383-386, 1996.
- RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. Cryptococcosis. In:\_\_\_\_\_ **Fungal infection diagnosis and management**. London, Blackwell Scientific, 1993. cap. 12, p. 115-122.
- ROESCH, E. W.; LUZ, C. A. S.; TREGNAGO, R.; SEVERO, L. C. Soromicologia da criptococose: a propósito de 51 casos estudados em Porto Alegre, RS. **Revista AMRIGS**, v. 39, p. 44-48, 1995.
- ROSAS, A. L. et al. Synthesis of polymerized melanin by *Cryptococcus neoformans* in infected rodents. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2845-2853, 2000.
- SAUBOLLE, M. A. Micologia e o laboratório clínico no diagnóstico das micoses respiratórias. In: SAROSI, G. A.; DAVIES, S. F. **Doenças fúngicas do pulmão**. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001, cap. 1, p. 1-16.
- SEVERO, L. C. Criptococose. In: SILVA, L. C. C. **Compendium de micologia**, São Paulo: BYK, 1991. cap. 57, p. 607-612.
- SHERDING, R. G. Micoses sistêmicas In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual saunders clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. cap. 12, p. 148-156.
- SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 287 p.
- SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 856 p.
- TANAKA, K. et al. The Eiken latex test for detection of a cryptococcal antigen in cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 127, p. 131-134, 1994.
- TILLEY, L. P.; SMITH JR., F. W. K. Criptococose. In: **Consulta veterinária em 5 minutos espécies canina e felina**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 598-599.
- TINTELNOT, K. et al. Disseminated cryptococcosis without cryptococcal antigen detection. In: CONGRESS OF THE EUROPEAN CONFEDERATION OF MEDICAL MYCOLOGY, 5. TAGUNG DER DEUTSCHSPRACHIGEN MYKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT, 33. **Mycoses**, v. 42, n. 3, 1999.
- TINTELNOT, K. et al. Case reports. Disseminates cryptococcoses without cryptococcal antigen detection. **Mycoses**, v. 43, p. 203-207, 2000.

THÉRAUD, M. et al. Comparative survival of clinical and environmental isolates of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* in natural and experimental conditions. **Journal Mycology Medicine**, v. 13, p. 93-97, 2003.

VECHIARELLI, A. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, p. 407-417, 2000.

WILLEMSE, T. Doenças fúngicas. In: **Dermatologia clínica de cães e gatos**. 2. ed., São Paulo: Manole, 1998. cap. 3, p. 21-26.

WU, T. C.; KOO, S. Y. Comparison of three commercial cryptococcal latex kits detection of cryptococcal antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1127-1130, 1983.

ZHU, X. et al. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5589-5596, 2001.

**ANEXO A****Preparação do Meio de Cultivo – Ágar Níger**

Ingredientes para o meio:

Sementes de Níger .....	150g
Ágar.....	20g
Cloranfenicol.....	30ml
Água destilada .....	1000ml

Modo de preparo:

- Ferver 150g das sementes em 700ml de água destilada por 30 min, mexendo algumas vezes;
- Triturar as sementes fervidas em liquidificador por 30 minutos;
- Filtrar com gaze (aberta dupla) espremendo até retirar todo o extrato;
- Adicionar ao filtrado 30ml de cloranfenicol, 20g de ágar e corrigir o volume para 1000ml com água destilada;
- Cozinhar o meio até obter uma consistência ideal;
- Esterilizar em autoclave a 121<sup>0</sup>C por 15 min.;
- Distribuir em Placas de Petri esterilizadas e estocar a temperatura de 4<sup>0</sup>C.



## ANEXO B

### Teste de Aglutinação em Látex

#### Material

- Reagente Látex: globulina de coelho anticriptocócica;
- Controle Látex: globulina de coelho normal;
- Controle Positivo: antígeno polissacarídeo de *Cryptococcus neoformans*;
- Controle Negativo: soro de coelho negativo;
- Amostra Diluente.

#### Protocolo qualitativo

- Pipetar 50µl do soro a ser testado, na câmara A e B;
- Pipetar 50µl do reagente látex na câmara A
- Pipetar 50µl do controle látex na câmara B
- Homogeneizar amostra, colocar a 160rpm por 10 minutos.
- Observar se houve aglutinação

#### Resultado qualitativo

- Não reagente: quando a amostra estiver homogênea, com aspecto leitoso, com ausência de aglutinação.
- Reagente: quando ocorrer aglutinação.

**Protocolo quantitativo**

- Pipetar 250µl da amostra diluente para uma diluição de 1:2 até 1:256;
- Pipetar 250µl da amostra no primeiro poço, homogeneizando e transferindo 250µl para o segundo poço. Repetir a transferência de 250µl para os poços subsequentes;
- Pipetar 50µl do Reagente Látex nos poços na fileira A;
- Pipetar 50µl do Controle Látex nos poços na fileira B;
- Homogeneizar a amostra, colocando a 160rpm por 10 minutos;
- Observar até qual diluição ocorre reação de aglutinação;

**Resultado quantitativo**

- As reações são graduadas sucessivamente.
- Não reagente: indicado por ausência de aglutinação.
- Reagente: indicado por presença de aglutinação.



