

DULCILENA DE MATOS CASTRO E SILVA

CONTRIBUIÇÃO PARA A HISTÓRIA NATURAL DA
CRIPTOCOCOSE: ANALISANDO ESPÉCIMES VEGETAIS E AR
ATMOSFÉRICO DE PARQUES DA CIDADE DE SÃO PAULO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador:

Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Dulcilena de Matos Castro e

Contribuição para a história natural da criptococose: analisando espécimes vegetais e ar atmosférico de parques da cidade de São Paulo / Dulcilena de Matos Castro e Silva – São Paulo, 2012.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientador: Marcia de Souza Carvalho Melhem

1. *Cryptococcus*
2. Plantas
3. Microbiologia do ar
4. Microbiologia ambiental

SES/CCD/CD-266/12

Ao Paulo, Leandro e Arthur

Se temos que esperar, que seja para colher a semente boa que lançamos hoje no solo da vida. Se for para semear, então que seja para produzir milhões de sorrisos de solidariedade e amizade

Cora Coralina

Aos amigos

"Compromisso é aquele ponto de viragem na sua vida em que se apercebe de um momento e o converte numa oportunidade de alterar o seu destino."

Denis Waitley

RESUMO

O papel principal que espécimes vegetais desempenham no ciclo de vida de fungos é fornecer matéria orgânica para sua proliferação e, nesse *habitat* já foram descritas diversas espécies que podem causar infecção humana. Desse modo, é importante conhecer os nichos naturais de agentes com potencial patogênico, de modo, a dar subsídios para medidas de prevenção e profilaxia para diminuir o risco de exposição humana. Dentre as espécies oportunistas, destacam-se membros do gênero *Cryptococcus* spp. que podem causar criptococose, uma das micoses sistêmicas mais letais na atualidade. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de *Cryptococcus* em nichos ambientais de parques da cidade de São Paulo, em particular, ocos de troncos de espécimes vegetais e ar atmosférico adjacente. Além disso, foi avaliado um novo meio de cultura para isolamento desses agentes. O estudo foi realizado com 45 exemplares, englobando 25 distintas espécies vegetais, localizados em 5 parques localizados nas 5 regiões da cidade. A coleta, de material orgânico retirado de cada oco e ar adjacente ao espécime vegetal, foi realizada trimestralmente, durante o período de um ano. Dois meios de cultura foram utilizados para isolamento de colônias de *Cryptococcus* spp., a saber: o meio clássico de *Guizzotia abssynica* (ágar niger) e um novo meio, denominado Dicloram Rosa Bengala modificado (DRBCm) que mostrou melhor desempenho para isolamento desses agentes. Cento e vinte e três isolados de *Cryptococcus* spp. foram obtidos de ocos vegetais (111; 90,2%) e ar atmosférico (12; 9,8%). Vinte (44,5%; 20/45) exemplares pertencentes a 19 espécies vegetais foram positivos para *Cryptococcus* spp.. As espécies de *Cryptococcus* encontradas em ocos foram: *C. neoformans* (61,2%; 68/111), *C. laurentii* (30,6%; 34/111), *C. albidus* (2,7%; 3/111) e *C. terrestris* (1,8%; 2/111). Sessenta e oito isolados de *C. neoformans* foram obtidos de amostras de *Hymenaea courbaril* e a identificação molecular por PCR/RFLP indicou o tipo molecular VNI. Em uma das amostras positivas para *C. neoformans* foi verificada, também, a presença concomitante de *C. albidus*. Em 3,6% (4/111) dos isolados de oco, a espécie de *Cryptococcus* não pode ser identificada pelos métodos empregados no estudo. Os resultados das análises de atmosférico indicaram a ocorrência de: *C. laurentii* (66,8% 8/12), *C. albidus*

(8,3%; 1/12), *C. humicola* (8,3%; 1/12), *C. flavescens* (8,3%; 1/12). Em 1 (8,3%; 1/12) isolado a espécie não pode ser identificada pelos métodos empregados. Quando comparadas as espécies de *Cryptococcus*, encontradas no oco de tronco e no ar adjacente, verificou-se que em 5 coletas (50%, 5/10) elas foram equivalentes. A espécie *C. laurentii* foi verificada em todas essas 5 coletas, as quais foram realizadas em: *G. japônica*, *M. nictitans*, *E. speciosa*, *T. granulosa* e *L. japonicum*. Foi relatado, de modo inédito, o encontro de espécies de *Cryptococcus* nas seguintes espécimes vegetais: *Vochysia tucanorum*; *Cedrela fissilis*; *Astronium flaxinifolium*; *Rapanea umbellata*; *Gryobotria japônica*; *Machoenium nictitans*; *Spathodea campanulata*; *Plumeria rubr*; *Casuarina cunninghamiana* e *Astronium flaxinifolium*, ressaltando a amplitude de nichos ambientais desses agentes. Conclui-se que a contaminação por *Cryptococcus* spp. é extensa em espécimes vegetais de parques da cidade de São Paulo, assim como a possibilidade de dispersão aérea desses agentes. O encontro de *C. neoformans* do tipo molecular VNI em matéria orgânica de *Hymenaea courbaril* (Jatobá) foi pioneiro, indicando mais uma fonte potencial de infecção para o agente mais freqüente de criptococose. O encontro de *C. albidus* junto a *C. neoformans* sugere a possibilidade de um marcador epidemiológico para o maior agente da criptococose mundial. Os resultados deste estudo permitem indicar um novo meio de cultura (DRBCm) para isolamento de *Cryptococcus* spp. a partir de amostras vegetais. Os dados deste estudo, somados aos de futuras investigações, que complementem a monitoração da ocorrência de agentes de criptococose em áreas de lazer da população urbana de São Paulo, constituem subsídios para medidas de vigilância sanitária para redução do risco de exposição da população a esses agentes oportunistas.

ABSTRACT

The main role of plant specimens in the life cycle of fungi is to provide organic matter to their proliferation. So, many species that cause human infection have been described in this habitat. It is important to know the natural niches of agents with pathogenic potential, allowing measures aiming prevention and prophylaxis to reduce the risk of human exposure. Among the opportunistic species, members of the genus *Cryptococcus* spp. are relevant, since they can cause cryptococcosis, one of the most lethal systemic mycoses nowadays. The objective of this study was to investigate the presence of *Cryptococcus* members in environmental niches of parks located in São Paulo city, in particular, hollow trunks of plant specimens and adjacent atmospheric air. In addition, we evaluated a new culture medium for the isolation of such agents. The study was performed with 45 trees, comprising 25 different plant species, located in five regions 5 parks located in the city. The collection of organic material removed from each hollow, and air adjacent to the specimen plant, was performed every three months during the period of one year. Two culture media were used for isolation of colonies of *Cryptococcus* spp.: the classic *Guizzotia abssynica* (niger agar) medium and a new medium, called modified Dicloran Rose Bengal (DRBCm) which showed better performance for detection of these agents. One hundred and twenty-three isolates of *Cryptococcus* spp. were obtained from tree hollows (111; 90.2%) and air (12; 9.8%) samples. Twenty (44.5%, 20/45) trees belonging to 19 species were positive for *Cryptococcus* spp. The following *Cryptococcus* species were found in hollow samples: *C. neoformans* (61.2%, 68/111), *C. laurentii* (30.6%, 34/111), *C. albidus* (2.7%, 3/111), and *C. terrestris* (1.8%, 2/111). Sixty-eight isolates of *C. neoformans* were obtained from samples of *Hymenaea courbaril*. Molecular identification by PCR / RFLP indicated the molecular type was VNI. One of the positive samples for *C. neoformans* isolates showed concomitant presence of an *C. albidus* isolate. In 3.6% (4/111) of isolates of hollow species identification of *Cryptococcus* couldn't determine by the methods employed in the study. The results of the study indicated the occurrence of atmospheric: *C. laurentii* (66.8% 8/12), *C. albidus* (8.3%, 1/12), *C. humicola* (8.3%, 1/12), and *C. flavescens*

(8.3%, 1/12). In 1 (8.3%, 1/12) isolated the species can not be identified by the methods employed. Comparing the *Cryptococcus* species, found in the hollow and the adjacent air, it was found that in five (50%, 5/10) occasions they were equivalent. The species *C. laurentii* was observed in all these 5 occasions, which were involved the following tree species: *G. japonica*, *M. nictitans*, *E. speciosa*, *T. granulosa* and *L. japonicum*. It was reported, for the first time, the occurrence of *Cryptococcus* species in the following plant specimens: *Vochysia tucanorum*; *Cedrela fissilis*; *Astronium flaxinifolium*; *Rapanea umbellata*; *Gryobotria japonica*; *Machoenium nictitans*; *Spathodea campanulata*; *Plumeria rubr*; *Casuarina cunninghamiana* and *Astronium flaxinifolium*, highlighting the range of environmental niches of such agents. It is concluded that contamination by *Cryptococcus* spp. is extensive in plant specimens located in parks in São Paulo city. The possibility of aerial dispersion of these agents were suggested. The finding of *C. neoformans* VNI molecular type of organic matter from *Hymenaea courbaril* (Jatoba) is pioneer, indicating one more potential source of infection for the most frequent agent of cryptococcosis. The finding of *C. albidus* along *C. neoformans* suggests the possibility of an epidemiological marker for the main agent of cryptococcosis. The results of this study allow us to recommend a new culture medium (DRBCm) for isolation of *Cryptococcus* spp. from plants. Data from this study, along with those from future research may complement the monitoring of the occurrence of agents of cryptococcosis in recreational areas of the urban population of São Paulo, and constitute subsidies for health monitoring measures to reduce the risk of public exposure to these agents opportunistic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AABB	Associação Atlética Banco do Brasil
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	American type culture collection
°C	Graus Celsius
CC	Controle de Crescimento
CE	Controle de Esterilidade
CIM	Concentração Inibitória Mínima
C.NI	<i>Cryptococcus</i> não pertencente às espécies <i>neoformans</i> , <i>gatii</i> , <i>laurentii</i> , <i>humicola</i> , <i>albidus</i> , <i>flavescens</i> e <i>terrestris</i> .
Cfr 13I	Enzima de restrição obtida pelo gene de <i>Citrobacter freundii</i>
CGB	Meio de cultura de cavanina – glicina - azul de bromotimol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DO	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRBC	Dicloran Rosa Bengala
DRBCm	Dicloran Rosa Bengala modificado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FCZ	Fluconazol
HhaI	Enzima de restrição obtida pelo gene de <i>Haemophilus haemolyticus</i> (ATCC 10014)
HIV	Human Immunodeficiency Vírus - Vírus da imunodeficiência
mg	Miligramas
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PCR	Polymerase Chain Reaction - Reação em cadeia da polimerase
NI	não Identificado
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms - Análise de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute
Sau96I	Enzima de restrição obtida pelo gene de <i>Staphylococcus aureus</i> PS96 (ATCC 49831)
SNC	Sistema Nervoso Central
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
UFC	Unidade formadora de colônia
URA5	Gene da enzima, ortidina monofosfato pirofosforilase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição dos tipos moleculares dos agentes da criptococose no Brasil e origem dos autores brasileiros com publicações em criptococose. A) tipos moleculares de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> (fonte: Trilles, Lazéra <i>et al.</i> ; 2008); B) publicações (fonte: Albuquerque e Rodrigues, 2012).	8
Figura 2	Ciclo ambiental proposto para <i>Cryptococcus</i> .	14
Figura 3	Foto aérea do Parque Trianon e indicação do local de coleta (Segundo: http://maps.google.com.br distância de 50m)	17
Figura 4	Foto aérea do Parque Horto Florestal(Segundo http://maps.google.com.br distância de 200m).	18
Figura 5	Foto aérea do Parque Horto Florestal e marcações dos pontos de coleta (Segundo http://maps.google.com.br distância de 50m)	18
Figura 6	Foto aérea do Parque Ecológico do Tiete – Inteiro (Segundo http://maps.google.com.br distância de 1km/2000 pés)	19
Figura 7	Foto aérea do Parque Ecológico do Tietê e indicação dos locais de coleta (Segundo http://maps.google.com.br distância de 50 m)	20
Figura 8	Foto aérea do Parque Raposo Tavares e indicação dos locais de coleta. (Segundo http://maps.google.com.br distância de 1000m)	21
Figura 9	Foto aérea da Associação Atlética Banco do Brasil e indicação dos locais de coleta (Segundo http://maps.google.com.br distância de 100m)	22
Figura 10	Localização dos parques na cidade de São Paulo, SP, Brasil, onde foram realizadas as coletas de material vegetal e ar atmosférico.	25
Figura 11	Ilustração dos espécimes vegetais amostrados no Parque Trianon com numeração dos exemplares.	27
Figura 12	Ilustração dos espécimes vegetais amostrado no Parque	28

	Horto Florestal com numeração dos exemplares.	
Figura 13	Ilustração dos espécimes vegetais amostrados no Parque Tietê, com numeração dos exemplares.	29
Figura 14	Ilustração dos espécimes vegetais amostrados no Parque Raposo Tavares com numeração dos exemplares.	30
Figura 15	Ilustração dos espécimes vegetais amostrados no Clube de Campo da Associação Atlética do Brasil, com numeração dos exemplares.	31
Figura 16	Esquema de processamento das amostras de espécimes vegetais.	32
Figura 17	Coleta de ar atmosférico com equipamento impactador	33
Figura 18	Placas semeadas com material de oco do Jatobá para pesquisa de colônias melanizadas, características de <i>Cryptococcus</i> spp.	33
Figura 19	Placas de Petri, contendo meio DRBCm, com crescimento de colônias de <i>Cryptococcus</i> (setas) em meio a desenvolvimento abundante de outras leveduras e fungos filamentosos.	45
Figura 20	Placas de Petri contendo meio de DRBCm ilustrando colônias primárias de isolados de <i>Cryptococcus</i> spp. com maior (esquerda) e menor (direita) produção de melanina após 7 dias de incubação a 25°C.	45
Figura 21	Gel de agarose 2% com técnica de eletroforese aplicada a cepas de <i>C. neoformans</i> , onde: M, marcador de peso molecular (100pb): linha 1 PCR, linha 2, 3, 4 e 5, cepas-padrão, respectivamente, tipo molecular VNI, VNII, VNIII, VNIV; linha 6 exemplo de perfil molecular (VNI) de 68 amostras isoladas de oco de tronco de <i>Hymenea carbaril</i> .	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ocorrência de <i>Cryptococcus</i> spp. em ocos de troncos de 20 exemplares de 19 espécies e 10 amostras de ar circundante de 9 espécies, localizados em 5 parques da cidade de São Paulo, Brasil	48
Tabela 2	Distribuição de espécies identificadas em isolados ambientais de <i>Cryptococcus</i> spp., segundo tipo de amostra coletada em parques da cidade de São Paulo, Br	49
Tabela 3	Contagem (ufc/mL) de leveduras melanizadas (LM), leveduras não-melanizadas (LNM) e fungos filamentosos (FF) em material de oco vegetal contendo alta carga de <i>Cryptococcus</i> spp., de acordo com o meio de cultura utilizado	51
Tabela 4	Contagem (ufc/mL) de leveduras melanizadas (LM), leveduras não-melanizadas (LNM) e fungos filamentosos (FF) em material de oco vegetal contendo baixa carga de <i>Cryptococcus</i> spp., de acordo com o meio de cultura utilizado	52
Tabela 5	Limite de detecção do DRBCm em relação ao niger para isolamento de <i>Cryptococcus neoformans</i>	52

APÊNDICES

Apêndice 1	Meios de cultura utilizados para isolamento de <i>Cryptococcus</i> spp.	77
Apêndice 2	Resultado da pesquisa (N, negativa; S, positiva) de espécies de <i>Cryptococcus</i> no Parque Trianon segundo: local de coleta, tipo de amostra e estação do ano (PR, primavera; V, verão; O, outono; I, inverno).	78
Apêndice 3	Resultado da pesquisa (N, negativa; S, positiva) de espécies de <i>Cryptococcus</i> no Parque Horto Florestal segundo: local de coleta, tipo de amostra e estação do ano (PR, primavera; V, verão; O, outono; I, inverno).	81
Apêndice 4	Resultado da pesquisa (N, negativa; S, positiva) de espécies de <i>Cryptococcus</i> no Parque Tiete segundo: local de coleta, tipo de amostra e estação do ano (PR, primavera; V, verão; O, outono; I, inverno).	86
Apêndice 5	Resultado da pesquisa (N, negativa; S, positiva) de espécies de <i>Cryptococcus</i> no Parque Raposo Tavares segundo: local de coleta, tipo de amostra e estação do ano (PR, primavera; V, verão; O, outono; I, inverno).	89
Apêndice 6	Resultado da pesquisa (N, negativa; S, positiva) de espécies de <i>Cryptococcus</i> no Clube AABB segundo: local de coleta, tipo de amostra e estação do ano (PR, primavera; V, verão; O, outono; I, inverno).	92

INDICE

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Criptococose	1
1.2 Agentes da criptococose	2
1.3 <i>Cryptococcus</i> spp. e árvores	11
1.4 <i>Cryptococcus</i> spp. e ar atmosférico	12
1.5 A cidade de São Paulo	15
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Locais de Coleta	24
3.2 Amostragem	25
3.3 Identificações dos espécimes vegetais	25
3.4 Coleta e processamento de amostras ambientais	26
3.5 Isolamento de colônias de <i>Cryptococcus</i> spp.	32
3.6 Identificação laboratorial de <i>Cryptococcus</i> spp.	34
3.7 Avaliação do desempenho do meio DRBC m	41
4. RESULTADOS	44
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. ANEXOS	74
9. APÊNDICES	77

1.INTRODUÇÃO

1.1 Criptococose

A criptococose, causada por leveduras encapsuladas do gênero *Cryptococcus*, é considerada importante micose sistêmica pelas formas pulmonar e de sistema nervoso central (SNC) (Perfect e Casadevall, 2002). A doença é uma das infecções oportunistas definidoras de Aids e, em países em desenvolvimento, ainda apresenta altas taxas de letalidade (Pappalardo e Melhem, 2003). Em 2009, Park e colaboradores relataram incidência mundial de mais de 900 mil casos de meningites causadas por *Cryptococcus*, à maioria associada à Aids, com taxa de mais de 600 mil mortes, nos três meses iniciais da infecção. A maior casuística foi descrita na África com cerca de 720 mil casos por ano (Park *et al.*, 2009). Na última década houve a utilização de tratamentos antirretrovirais potentes (*high antirretroviral therapy*-HAART), que levaram à redução da incidência global da criptococose; porém em países com baixo desenvolvimento sociocultural a doença ainda representa um problema de saúde pública (Pappalardo *et al.* 2009).

Ainda que a criptococose tenha baixa incidência em relação a outras micoses, como candidíases, por exemplo, sua importância é grande dado suas recidivas e sequelas, além das altas taxas de mortalidade (Lin e Heitman, 2006). O comprometimento do SNC, sob-forma de *meningoencefalite*, é a manifestação mais grave da doença (Perfect e Casadevall, 2002). As taxas de mortalidade observadas nessa forma clínica em pacientes com Aids situam-se entre 15% a 20%, nos primeiros três meses da doença fúngica, mesmo em países onde HAART está, amplamente, disponível (Lortholary *et al.*, 2006).

Embora a forma clínica mais comum da criptococose seja a meningoencefalite, a infecção inicial é pulmonar após a inalação de partículas infectantes dos agentes etiológicos, presentes no meio ambiente. Formas haplóides desidratadas da levedura, blastoconídios, ou formas sexuadas, basidiósporos, são as partículas citadas como as infectantes (Lin e Heitman,

2006). Essas partículas entram pelo trato respiratório, levando à criptococose-infecção que pode ser sintomática ou assintomática.

A adaptação de *Cryptococcus* spp. ao hospedeiro, para sua manutenção *in vivo* e a preservação de sua virulência durante seu estágio subclínico, é um tema intrigante para o qual ainda não há muitas explicações (Ellis e Pfeiffer, 1990; Pappalardo *et al.*, 2009). Na dependência de certos fatores, principalmente, as condições do sistema imune do hospedeiro, virulência do isolado e, também, volume de inóculo inalado, a criptococose pode permanecer assintomática, ou tornar-se sintomática (Bicanic *et al.*, 2005; Kwon-Chung, *et al.*, 1992). A manifestação clínica pode ocorrer se houver comprometimento da imunidade do hospedeiro, permitindo, assim, reativação do foco latente pulmonar. A partir do pulmão, via hematogênica, o agente pode infectar qualquer órgão causando infecções localizadas ou sistêmicas. Tecidos extra-pulmonares, como: pele, olhos, miocárdio, ossos, articulações, pulmões, próstata e trato urinário podem ser acometidos, mas em regra, o SNC é o local mais atingido pela doença (Bailly *et al.*, 1991).

Para melhorar o prognóstico dos casos de criptococose, o tratamento deve ser adequado e instaurado, imediatamente, após o diagnóstico clínico e/ou laboratorial (Pappalardo *et al.*, 2009). O tratamento, de acordo com o estado imunitário do paciente, inicia-se com anfotericina B e segue com fase de consolidação e manutenção com fluconazol. Durante o período de manutenção pode ocorrer reativação de células do agente etiológico, presentes em focos quiescentes como pulmão e próstata, que poderiam justificar a ocorrência de recidivas (Mitchell e Perfect 1995). A exposição longa à medicação, em particular o fluconazol, pode provocar seleção de células menos sensíveis ao fármaco, associadas ao surgimento de resistência secundária associada à falha terapêutica (Perea *et al.*, 2002; Groll *et al.*, 2004).

1.2 Agentes da criptococose

Cryptococcus compreende 37 espécies, sendo que apenas algumas foram descritas como agentes de criptococose, incluindo: *C. neoformans*, *C.*

gattii, *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. unigutulattus*, *C. curvatus* e *C. humicola* (Harris et al., 2011). Dentre as espécies menos prevalentes, como agentes de criptococose, *C. laurentii* e *C. albidus* causam a grande maioria das infecções (80%), seguidos de *C. unigutulatus*, *C. curvatus* e *C. humicola* (Johnson et al. 1998). Esses agentes oportunistas foram relacionados à pacientes com imunossupressão, sendo que, dentre eles, *C. laurentii*, o principal agente de micose, tanto da forma pulmonar, quanto meningeal, podendo atingir tecido cutâneo, como relatado em vários casos na Índia (Shankar et al., 2006).

C. neoformans é o agente mais comum da criptococose e seu possível isolamento ocorreu em 1894 por Sanfelice, a partir de amostra de suco de pêssago; porém, a descrição completa do ciclo biológico desse agente ocorreu, somente, em 1975 por Kwon-Chung e colaboradores (Kwon-Chung et al., 2000). Estes pesquisadores descreveram a presença de dois tipos conjugantes distintos, em *C. neoformans*, denominados α e a . Do cruzamento, *in vitro*, entre eles surgem estruturas sexuadas (fase teleomorfa) chamadas basidiósporos. Com esta descrição, *Cryptococcus* passou a ser classificado como um basidiomiceto, denominado *Filobasidiella*, com duas variedades da espécie: *C. neoformans* variedade *neoformans* (*F. neoformans* var. *neoformans*) e *C. neoformans* var. *gattii* (*F. neoformans* var. *bacillispora*) (Kwon-Chung et al. 1982). No entanto, em 2006, durante o 16º Congresso Internacional de Micologia Médica e Humana (ISHAM), ficou definido em consenso que essas duas variedades seriam espécies independentes: *C. neoformans* e *C. gattii*. A espécie *C. neoformans* foi dividida em duas variedades de acordo com seu sorotipo: var. *neoformans* (sorotipo D) e var. *grubii* (sorotipo A). Esta última havia sido descrita por Franzot e colaboradores em 1999, após estudos moleculares. Posteriormente, foi reconhecido a existência de cepas híbridas, classificadas como sorotipo AD e enquadradas na espécie *C. neoformans*. Por sua vez, a espécie *C. gatti* engloba os sorotipos B e C (Kwon-Chung e Varma, 2006; Levitz e Boekhout, 2006; Lin e Heitman, 2006). Os sorotipos (A, B, C, D ou AD) são definidos de acordo com a composição de polissacárides presentes na cápsula. Recentemente, por técnicas de *Amplified Fragment Length Polimorphism* e *Multi Locus Sequence Typing* (AFLP e MLST) foi revelada a existência de um novo tipo molecular de *C. neoformans* (genótipo VNB),

descrito em Botswana, que parece ser, geograficamente, restrito à África sub-Saariana (Litvintseva *et al.*, 2007).

Criptococose, em todo o mundo, é causada com maior frequência por *C. neoformans*, mesmo em áreas onde *C. gattii* é endêmico (Currie e Casadeval, 1994). *C. neoformans* variedade *grubii* era e continua sendo a maior responsável (até 99%) pela criptococose em indivíduos infectados pelo HIV, em todo o mundo com exceção da África (Mitchell e Perfect, 1995; Pappalardo e Melhem, 2003).

Aspectos biológicos dos agentes

As células de *Cryptococcus* apresentam morfologia com características marcantes, como: parede expressa, inclusões citoplasmáticas, multibrotamento e a principal delas, usada para sua identificação: cápsula mucopolissacarídica (Kwon-Chung *et al.*, 1992). Estudos mostram que a cápsula apresenta densidade variada, sendo menor com o distanciamento da parede celular e na borda da cápsula, região de interface com fagócitos, os polissacarídeos capsulares apresentam baixa densidade, conferindo maior plasticidade e permeabilidade às macromoléculas (Gates *et al.*, 2004).

Além da cápsula, a produção de pigmentos semelhantes à melanina é outro fator de grande importância para caracterização do gênero *Cryptococcus*. Este pigmento está localizado na parede celular do fungo e contribui para a virulência e manutenção da integridade da parede celular (Kwon-Chung *et al.*, 1982). Melaninas são pigmentos escuros e multifuncionais, com alto peso molecular produzidos por enzimas lacases. As lacases de *C. neoformans* e *C. gattii* possuem atividade de fenoloxidase, converte compostos difenólicos em melanina. Desse modo, cultivos de *C. neoformans* e *C. gattii*, na presença destes percussores, apresentam colônias de coloração marrom claro a marrom escuro (Kwon-Chung *et al.*, 1982). Esta característica foi descrita primeiro por Staib (1963), ao demonstrar que a pigmentação da colônia estava relacionada com o cultivo em extrato de sementes de *Guizotia abyssinica (niger)* para alimentação de pássaros que contém compostos fenólicos.

O gênero *Cryptococcus* tem, além dessas, a característica de produzir a enzima urease. Para identificação fenotípica das espécies, existem provas bioquímicas, como: assimilação de fontes de carbono e crescimento a 37°C. Um teste bioquímico, realizado em meio contendo canavalina, glicina e azul de bromotimol (CGB), é usado para diferenciar, fenotipicamente, *C. neoformans* e *C. gattii*. Esta última espécie é, naturalmente, resistente à L- canavalina e utiliza a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, elevando o pH do meio de cultura revelado pela alteração da cor (verde para azul) pela ação do indicador azul de bromotimol. *C. neoformans*, por outro lado, é sensível à L- canavalina e não assimila a glicina e, portanto, não modifica a cor do meio (Kwon-Chung *et al.*, 1982).

A prova realizada com meio CGB, no entanto, não permite a determinação precisa da espécie, sendo necessário estudo molecular para essa confirmação como descrito a seguir. As ferramentas moleculares, além disso, permitem identificar espécies crípticas as quais são impossíveis de serem determinadas por provas fenotípicas. Por exemplo, os métodos fenotípicos não conseguem identificar a presença de espécies crípticas em fenótipos de *C. laurentii*. Para tanto, o sequenciamento de alguns gens deve ser realizado, para essa identificação. Desse modo, técnicas mais complexas devem ser empregadas para avaliar os agentes da criptococose, com vistas a aumentar o conhecimento da distribuição de seus agentes (Ferreira–Paim *et al.*, 2012).

Os métodos moleculares, ainda, podem detectar variação genética entre isolados de mesma espécie; isto é importante para certos patógenos que podem apresentar diferenças na composição antigênica, virulência, sensibilidade aos agentes terapêuticos, entre outros (Pfaller *et al.*, 1995). Dentre as diversas técnicas que foram empregadas para estudo genético de cepas de *Cryptococcus* spp, a de restrição para obtenção de fragmentos polimórficos do DNA (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) é a mais, comumente, empregada para diferenciar cepas patogênicas de *Cryptococcus* (Pasa, 2011). A técnica de RFLP propicia no caso de *C. neoformans* e *C. gattii* a definição de 8 tipos moleculares, sendo 4 para cada espécie. *C. neoformans* var. *grubii* (genótipos VNI e VNII, sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (genótipos VNIV, sorotipo D) e a forma híbrida (genótipo VNIII, sorotipo AD).

Para *C. gattii*, são reconhecidos VGI, VGII, VGIII e VGIV (sorotipos B e C) (Meyer *et al.*, 1999; 2009).

Distribuição dos agentes: cepas clínicas

De acordo com os achados de Kwon-Chung (1984) as infecções causadas por *C. gattii* eram descritas, apenas, em indivíduos que residiam perto de florestas tropicais ou viviam em países de climas tropical ou subtropical. Nos anos 90, no entanto, informações novas surgiram sobre a epidemiologia das infecções por *C. gattii*. Em regiões endêmicas, como Austrália e Nova Guiné, houve a comprovação de que *C. gattii*, ao contrário de *C. neoformans*, infectava, preferencialmente, pessoas imunocompetentes (Ellis e Pfeiffer, 1990). Até os dias de hoje, ao contrário de *C. neoformans* ganhou destaque desde o início da pandemia de Aids, por acometer indivíduos imunocomprometidos, *C. gattii* manteve-se um agente de doença, quase que exclusivo, de pessoas sem imunossupressão aparente. Por isso, até hoje, os inúmeros casos de criptococose por *C. neoformans* em Aids têm incidência crescente, enquanto a taxa de infecções por *C. gattii* tem-se mantido, relativamente, estável nos últimos anos (Gillece *et al.*, 2011).

A distribuição de *C. gattii* permaneceu, por muito tempo, limitada a áreas geográficas onde as temperaturas não eram muito baixas no inverno (Kwon-Chung *et al.*, 1982). A importância da infecção por *C. gattii* ficou, assim, em segundo plano, por muitos anos, até o surgimento de um surto, na ilha de Vancouver, Canadá, que foi responsável por mais de 200 casos de criptococose em indivíduos, aparentemente, saudáveis além de casos veterinários (CDC, 2010). Houve, a seguir, descrição de vários casos humanos na costa oeste dos Estados Unidos e no estado de Oregon, que resultaram em 19 mortes, além de relatos de infecção sintomática em centenas de animais (CDC, 2010). Foi demonstrado que um subtipo molecular de VGII, mais virulento que os demais, foi à causa do surto canadense-norte americano (CDC, 2010).

No continente asiático infecções por *C. gattii* foram relatados no Vietnã,

Camboja, Tailândia, Coréia, Japão, Índia, Malásia, China e Nepal. No Vietnã, um estudo mostrou que 30% dos pacientes com meningite criptocócica e não-infectados pelo HIV estavam infectados com *C. gattii* do tipo molecular VGI (Gillece *et al.*, 2011). Esses dados ressaltam a importância clínica dessa espécie, que até duas décadas atrás era deixada em segundo plano e também fortalece a relevância da tipagem molecular dos agentes da criptococose.

Na América do Sul, um grande e pioneiro estudo ibero-americano mostrou que os quatro tipos moleculares de *C. gattii* ocorrem na América-Latina, com predominância de VGII (Meyer *et al.*, 2003). A presença de *C. gattii* como agente infectante não é incomum, particularmente, nos países situados nos trópicos e subtropicais. Na Venezuela, um estudo mostrou que *C. gattii* representa entre 4% a 9,1% dos isolados clínicos (Perez *et al.*, 2008).

No Brasil, *C. gattii* confirma seu comportamento como patógeno primário, infectando indivíduos imunocompetentes. A criptococose causada por *C. neoformans* ocorre em todas as regiões. *C. gattii* causa criptococose endêmica em hospedeiros imunocompetentes nas regiões norte e nordeste do Brasil (Trilles *et al.*, 2008; Lazéra *et al.*, 2000). Nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo a maioria dos pacientes apresenta *C. neoformans* (Calvo *et al.* 2001; Távora *et al.*, 2003; Rozenbaum *et al.*, 1992; Martins *et al.*, 2003; Nishikawa *et al.*, 2003). Isso pode ser explicado porque nas grandes zonas urbanas do Sul e Sudeste do país, vive mais de 70% da população com Aids que tem como agente da criptococose a espécie *C. neoformans* (Brito *et al.*, 2001).

Sobre os tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii*, que ocorrem no Brasil, excelente revisão de Trilles e colaboradores (2008) mostra os trabalhos de pesquisadores brasileiros (Figura 1A). A criptococose causada por *C. neoformans* demonstra ampla distribuição de tipos moleculares, sendo que apenas VN IV não foi descrito em casos clínicos. Para *C. gattii*, todos os tipos moleculares foram relatados, com menor encontro de VG I (Trilles e *et al.*, 2008). Albuquerque e Rodrigues (2012) por sua vez, destacam os centros de pesquisa do país, revelando locais onde ainda não se tem estudos relacionados com a criptococose, deixando claro que há carência de dados nacionais sobre a doença e seus agentes etiológicos (Figura 1B). Nota-se que

na região sudeste e sul há muitos estudos e, de outro modo, poucos estudam as regiões centro-oeste, nordeste e norte.

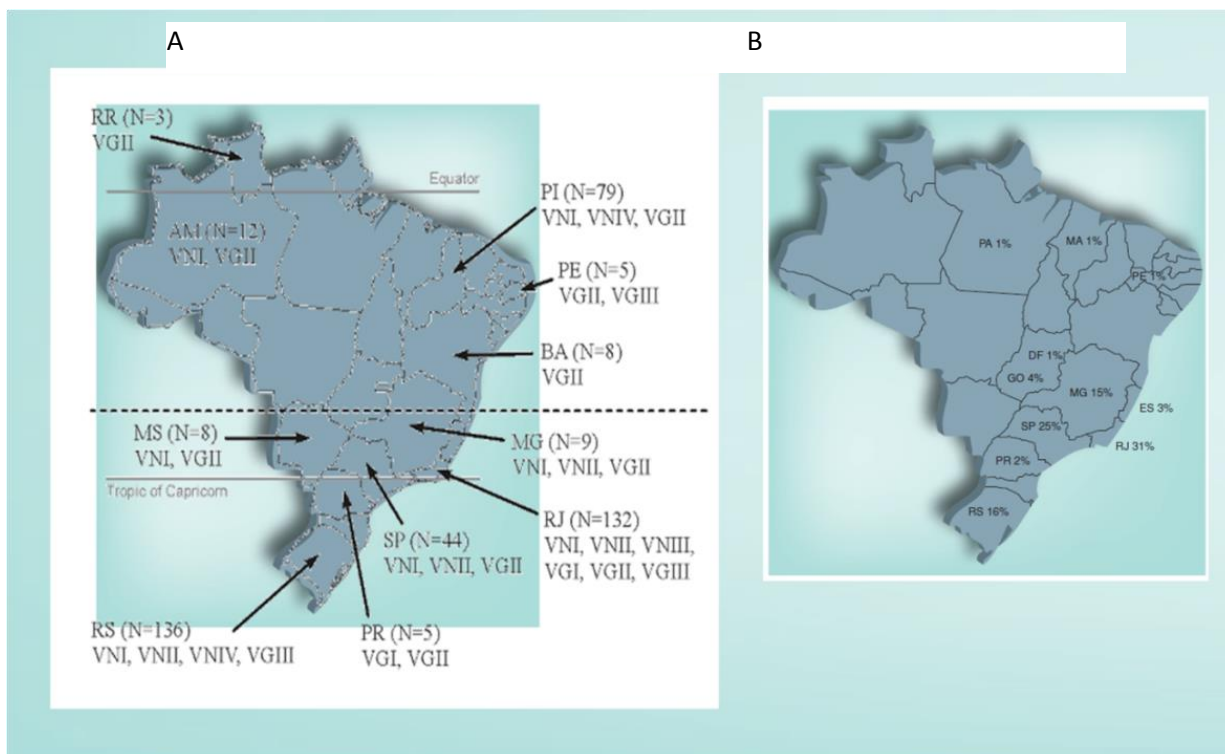


Figura 1. Distribuição dos tipos moleculares dos agentes da criptococose no Brasil e origem dos autores brasileiros com publicações em criptococose. A) tipos moleculares de *C. gattii* e *C. neoformans* (fonte: Trilles, Lazéra *et al.*; 2008); B) publicações (fonte: Albuquerque e Rodrigues, 2012).

Distribuição dos agentes: cepas ambientais

A partir de amostras de solo, onde há fezes de pombos e outras aves, é frequente o isolamento de *Cryptococcus*, desde que, os dejetos animais apresentem compostos nitrogenados e lignina que favorecem a multiplicação celular desse agente (Xue *et al.*, 2006; Lazéra *et al.*, 1998). *C. neoformans* tem larga distribuição ambiental, em particular, em excrementos de pássaros. Em contraste, *C. gattii* tem, aparentemente, menor tolerância a níveis altos de creatinina e, por isso, tem sido isolado com mais frequência de matéria orgânica de origem vegetal que parece constituir um reservatório natural para a espécie (Lazéra *et al.*, 2000). Existem evidências claras sobre a dispersão

ambiental de *C. gattii* em áreas urbanas, incluindo ar atmosférico e detritos vegetais ou animais (Kwon-Chung *et al.*, 1992, Horta *et al.*, 2002).

A importância da pesquisa ambiental dos agentes de criptococose foi comprovada pelas ações que se seguiram ao surto por *C. gattii* na América do Norte. Amostragem ambiental ampla, incluindo: ar, água e solo, em associação a diversos tipos de materiais, na área do surto canadense, revelaram áreas albergando, basicamente, três dos genótipos de *C. gattii* (Byrnes *et al.*, 2011). A preocupação crescente com a emergência de *C. gattii* como agente de infecção grave levou à busca dessa espécie no meio ambiente, que passou a ser, intensamente, pesquisado. Em consequência, essa espécie foi descrita em distintas regiões, com particular atenção para áreas de clima temperado e frio (Byrnes *et al.*, 2011). A hipótese de que *C. gattii* tem um *habitat* predominantemente relacionado à deterioração da madeira ganhou força com o estudo recente de Romeo e colaboradores (2011) que demonstraram *C. gattii* em amostras de diversas espécies de vegetais na Espanha. Esse achado leva à suposição de que em regiões em que ocorre desmatamento, por processos de urbanização e outras ações antrópicas, poderia haver grande disseminação de *C. gattii* (Morera-López *et al.*, 2005, Pedroso *et al.*, 2007). No entanto, a correlação entre isolados ambientais em dada região e sua ocorrência como agente da criptococose naquela área é ainda, incerta. Trilles (2011) porém enfatizam a alta frequência, na região nordeste do país, de isolados clínicos de *C. gattii*, onde essa espécie é, particularmente, bem adaptada a biótipos ambientais associados à deterioração da madeira, como demonstra a tipagem de isolados ambientais.

Em 1998, Lazéra e colaboradores iniciaram as pesquisas ambientais no Brasil, visando identificar fontes naturais dos agentes da criptococose em nosso país. Outros pesquisadores também seguiram a mesma linha e realizaram trabalhos por vários estados brasileiros. Baroni e colaboradores (2006) estudaram durante um ano, a presença de *C. neoformans* em nichos de 10 igrejas situadas na cidade do Rio de Janeiro. A espécie foi isolada de amostras de solo, insetos, ovos e/ou ninhos de pombos. A maior prevalência (37,8%) foi encontrada em amostras de excretas de pombos (Baroni *et al.*, 2006). No Paraná, Lugarini e colaboradores (2008) pesquisaram a presença

de *C. neoformans* em 141 amostras de excretas de psitacídeos e encontraram 25,5% (36/141) de amostras positivas para *C. neoformans* variedade *neoformans*. Em Goiás, uma pesquisa para *C. neoformans* foi realizada em 290 amostras de excrementos de aves e matéria orgânica, por Kobayashi e colaboradores (2005), com resultado de 20,3% de positividade nas amostras fecais.

No estado de São Paulo, cinco pesquisas ambientais foram publicadas, segundo literatura consultada, sendo que a maioria (4/5) delas relatou isolamento de *Cryptococcus* de amostras ambientais no interior do estado e apenas um relato refere-se à cidade de São Paulo. Em nenhuma delas, porém, foram usados métodos moleculares para diferenciação melhor das espécies encontradas. Soares e colaboradores (2005) realizaram estudo de amostras ambientais na cidade litorânea de Santos, onde coletaram 79 amostras de fezes de pombos, com positividade de 13,9% (11/79) para *C. neoformans* var. *Grubii*. Os autores obtiveram também, isolados de outras espécies de *Cryptococcus*, tais como *C. albidus* (12,6%) e *C. laurentii* (8,9%). Em Ribeirão Preto, foram realizados dois estudos ambientais. Um deles, realizado em 2004 por Silva e colaboradores, avaliou fezes de pombos, colhidas em praças da cidade. Foram encontrados, nesse estudo, isolados de *Cryptococcus* spp. em 75% (38/51) das amostras, incluindo: *C. laurentii* (n=4), *C. unigutulatus* (n=3), *C. laurentii* associado a *C. albidus* (n=4) e *C. unigutulatus* associado a *C. laurentii* (n=1). O segundo estudo feito em Ribeirão Preto foi realizado por Pedroso e colaboradores (2009), englobando 54 amostras de fezes, com resultados positivos para 12 isolados de *C. neoformans*, 12 de *C. albidus*, 7 de *C. laurentii* e 2 de *C. uniguttulatus*. Rezende e colaboradores (2008) pesquisaram fontes ambientais de *Cryptococcus* em Votuporanga, cidade do interior de São Paulo. Nesse estudo, os autores analisaram 30 amostras de fezes colhidas em áreas públicas não obtendo isolamento de *Cryptococcus* de nenhuma amostra. Os autores relacionaram os resultados negativos à grande quantidade e diversidade de fungos filamentosos existentes no material analisado que poderiam ter impedido o crescimento de colônias de *Cryptococcus* spp. Na cidade de São Paulo, Montenegro e Paula (2000) realizaram coletas, em 38 locais diferentes da cidade, de

amostras de madeira, serrapilheira e fezes de aves coletadas durante dois anos. Os autores obtiveram 10 (26,3%) amostras positivas para *C. neoformans* e 2 isolados de *C. gattii*, obtidos da serrapilheira de mata de *Eucalyptus* do parque Ibirapuera.

Esses dados e suposições enfatizam a importância do conhecimento das fontes ambientais, em particular aquelas relacionadas a espécimes vegetais, dos agentes da criptococose.

1.3 *Cryptococcus* spp. e árvores

Árvores, aparentemente, fazem parte importante do ciclo de *Cryptococcus* spp. Xue e colaboradores (2007) realizaram experimentos com madeiras e folhas vegetais de eucalipto e *Arabidopsis*, obtendo proliferação de colônias de *C. neoformans* e *C. gattii*. Mais importante, ainda, foram os resultados obtidos dos testes para obtenção da fase sexuada dessas espécies. Os autores provaram que o ciclo sexuado de reprodução é estimulado por ferormônios vegetais, o que pode refletir que as condições ambientais ideais para a fase sexuada dos agentes da criptococose sejam as disponíveis em superfícies vegetais (Xue *et al.*, 2007).

Os primeiros isolamentos de *C. gattii*, a partir de espécimes vegetais foram obtidos a partir de *Eucalyptus camaldulensis* na Austrália, em 1990, por Ellis e colaboradores. Em 1992, a mesma equipe publicou o isolamento de *C. gattii* de casca, restos de madeira e oco em tronco de outra espécie, *E. tereticornis*. No Brasil, Lazéra e colaboradores (1993) isolaram *C. neoformans* e *C. gattii* de oco da árvore *Syzygium jambolanano*, no Rio de Janeiro. Este fato foi de grande impacto na literatura mundial, porque revelou a ocorrência de *C. gattii* e *C. neoformans* em outro tipo de árvore, diferente do *Eucalyptus*. Em 2000, Lazéra e colaboradores conseguiram isolar *C. gattii* e *C. neoformans* a partir de um único oco de árvore, verificando que, uma vez presente *C. neoformans* na matéria orgânica, esta espécie conseguia se estabelecer melhor do que *C. gattii* nesse nicho (Lazéra *et al.*, 2000). Interessante que todas as árvores positivas para *Cryptococcus*, nesse estudo, apresentaram

condições ruins de conservação, apresentando grandes áreas de deterioração da madeira de tronco. Alguns isolamentos também ocorreram a partir de amostras de galhos soltos que preenchem o oco, o que sugeriu aos autores que o nicho de *C. neoformans* não tenha relação com o envelhecimento da árvore, mas sim ao depósito de detritos orgânicos formado com o passar do tempo que poderiam ser biótopos naturais para essa espécie (Lazéra *et al.*, 2000).

1.4 *Cryptococcus* spp. e ar atmosférico

O ar ambiente é dispersor de diferentes partículas, sendo reconhecido como veiculador de esporos fúngicos (Goncalves *et al.*, 2010). Existem, de fato, diversas espécies de fungos que utilizam o ar como dispersor de seus esporos, que podem ser encontrados no solo, na água, em animais, sobre e sob vegetação. Tais fungos são denominados anemófilos e seus esporos estão presentes no ar atmosférico, mesmo com variações climáticas, como chuva, vento e umidade (Távora *et al.*, 2003). A microbiota fúngica pode ser semelhante, ou diferente, em cada cidade ou região e pode sofrer variação sazonal. A importância dos bioerosões tem sido enfatizada, nas últimas décadas, pois sua presença em determinados ambientes pode interferir na saúde das pessoas (Crestani *et al.*, 2009; Baroni *et al.*, 2006). É consenso que *Cryptococcus*, ainda que não seja um fungo anemófilo, utiliza o ar atmosférico como dispersor de seus esporos e que quase a totalidade das infecções por *Cryptococcus* spp. é adquirida por inalação de propágulos infectantes presentes no meio ambiente. Mesmo em matéria orgânica dessecada as células desse agente mantêm-se viáveis e, portanto, com potencial infectante (Bulmer, 1990). Células desidratadas de *Cryptococcus* podem ser menores que 2 µm de diâmetro e, com isso, são facilmente aerossolizadas e inaladas. Alguns estudos sugerem que basidiósporos (fase sexuada) que medem, aproximadamente, 1,8 µm por 2,5 µm são mais resistentes à dessecação do que blastoconídios (células assexuadas em forma de leveduras capsuladas). Desse modo, basidiósporos teriam maior facilidade em se mater em aerossóis, contribuindo, assim, para maior potencial infectante, como demonstrado em

animais de laboratório (Filiu, *et al.*, 2002).

Passoni e colaboradores (1998) coletaram 824 amostras ambientais, incluindo: poeira domiciliar, solo de área externa, excretas de pássaros em residências do Rio de Janeiro (Passoni *et al.* 1998). Eles isolaram *C. neoformans* em 15,6% (5/32) das residências de pacientes com criptococose associada a Aids, em 8,9% (4/45) das residências de pacientes com Aids, mas sem criptococose e em 14,3% (11/77) residências de indivíduos saudáveis. O principal fator associado ao encontro residencial de *C. neoformans* foi à presença de pássaros no ambiente domiciliar ou peridomiciliar. O isolamento de *C. neoformans* em 13% (20/74) das residências reforça a observação da exposição frequente do ser humano a esse fungo. Correlação significativa entre a existência de pombos próxima ao ambiente domiciliar e probabilidade de contaminação dessa residência por *C. neoformans* permitiu comprovar que paciente com Aids apresentam risco maior de adquirir a doença quando residentes em domicílios com resultados positivos para isolamento do agente (Silva *et al.*, 2008).

Animais circulantes podem estar ligados à disseminação de determinada espécie, como *C. gattii*, conforme descrito para os coalas na Austrália (Lin e Heitman, 2006). Esses animais, assim como os pombos, ainda que dispersores dos esporos dos agentes da criptococose, não desenvolvem a doença. Outras espécies, no entanto, adquirem a doença em formas clínicas distintas, mas também são veiculadores dos agentes (Lin e Heitman, 2006). *Cryptococcus* spp. infecta uma grande variedade de animais, embora nem todos apresentem todos os sintomas clássicos da infecção humana. Cangurus, gatos, cães, pássaros, cavalos, alpacas, furões e ovelhas infectados foram encontrados na Austrália e América do Norte; outros animais terrestres documentados com a doença incluem: cabras, alces, esquilos e camelídeos (Lin e Heitman, 2006). Vale lembrar que *Cryptococcus* foi isolado pela primeira vez de animais a partir de linfonodos de um bovino doente por Sanfelice (1985). Mamíferos marinhos também podem apresentar espécies de *Cryptococcus*, como relatado por Martins e colaboradores (2002) que avaliaram 108 amostras de secreção respiratória de três golfinhos em um cativeiro de Portugal, encontrando 9% *C.*

laurentii.

O isolamento de *C. neoformans* também já foi realizado a partir de pequenos artrópodes, conforme Souza e colaboradores (2011). Os autores encontraram positividade de 3,3% (5/150) em amostras coletadas de *Periplaneta americana* (barata); esses achados confirmam que insetos sinantrópicos e outras pragas urbanas podem funcionar como vetores de agentes da criptococose (Souza *et al.*, 2011).

O papel das árvores, na dispersão de propágulos de *C. neoformans* pelo ar atmosférico foi evidenciado por Lazéra e colaboradores (2000) consideravam o aspecto importante na criptococose (2000). Os autores levantaram a hipótese de que o ar da entrada dos ocos de árvores, ou adjacente a lesões no tronco causadas por agressores como pequenos animais, poderiam dispersar os propágulos do fungo. Em áreas endêmicas para criptococose, árvores caídas poderiam, também, estar relacionadas com aerolização de partículas fúngicas caracterizando uma fonte para infecção humana (Lazéra *et al.*, 2000).

A Figura 2 ilustra uma proposta de ciclo natural dos agentes de criptococose. O ciclo teria início com a presença das partículas infectantes em ocos de espécimes vegetais, a partir dos quais seriam dispersas pelo ar atmosférico (bio-aerossóis) para ambientes aquáticos e ambientes habitados por animais hospedeiros, ou vetores, que contribuiriam para aumentar os bio-aerossóis com potencial de causar infecção humana via inalatória (Chatuverdi e Nierman, 2012)

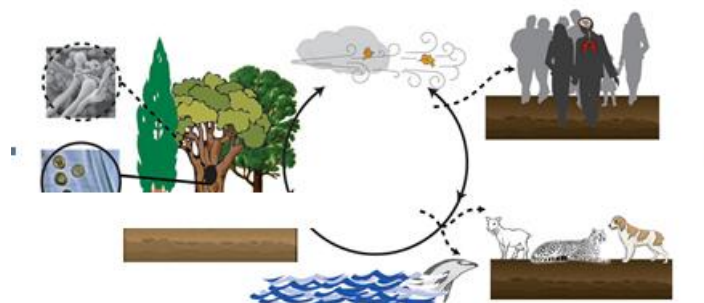


Figura 2. Ciclo ambiental proposto para *Cryptococcus*

A adaptação aos diferentes nichos e hospedeiros leva à micro-evolução, já descrita em cepas de *C. neoformans*, resultando em mudanças fenotípicas e/ou genotípicas (Casadevall *et al.* 1998). Além disso, a convivência com fungos anemófilos, ou com leveduras de outros gêneros e, até mesmo, bactérias pode resultar em desenvolvimento de mecanismos de escape ou estimular fatores de sobrevivência. As alterações poderiam influenciar aspectos de topografia e cor da colônia, tamanho da cápsula, produção de melanina, esteróis presentes na membrana, suscetibilidade a fármacos antifúngicos e fatores de virulência (Osterholzeret *et al.*, 2011). A criptococose, embora seja uma doença grave, dada sua letalidade alta e a sua ocorrência em indivíduos sem doença aparente, pouco se conhece da ecologia de seus agentes, visto que seu ciclo, ainda, é apenas uma proposta.

1.5 A cidade de São Paulo

Sabe-se que a criptococose ocorre, em regra, por via inalatória e seria importante avaliar a presença dos seus agentes em áreas com grandes aglomerados populacionais. Poucos trabalhos foram desenvolvidos em grandes cidades para avaliar a presença de *Cryptococcus* em áreas urbanas como a cidade de São Paulo. O monitoramento desses ambientes, ao longo do tempo, é importante, pois fatores externos como temperatura e estação do ano poderiam influenciar a taxa de isolamento desses micro-organismos de fontes ambientais. Investigações sucessivas poderiam contribuir para verificar alterações e tendências dos contaminantes ambientais e como isso pode afetar a exposição da população urbana a agentes etiológicos tradicionais ou emergentes, como no caso de *C. gattii*, ou até outras espécies.

A extensão da cidade de São Paulo e a variabilidade de seus biótopos são grandes desafios para a descoberta de reservatórios naturais dos agentes da criptococose, importantes vértices da história natural dessa doença. A

região metropolitana, constituída por 39 municípios, faz dessa cidade, a segunda maior do mundo. A região apresentou, em curto período de tempo, rápido crescimento populacional gerando diversos conflitos e graves problemas urbanos, que acabou afetando a qualidade de vida de seus habitantes. A natureza predatória da ocupação do solo tem levado à alteração dos recursos naturais da região, tendo sido devastado cerca de 900km² de vegetação (Sepe *et al.*, 2008). Com as alterações, o meio ambiente e, mais especificadamente, os parques urbanos sofreram e sofrem estas mudanças. As áreas verdes exercem várias funções e assumem importante papel na vida cotidiana dos cidadãos, por se tratarem de espaços que servem como base para atividades de lazer e recreação ao ar livre e que fornecem múltiplos usos para a comunidade amenizando os impactos ambientais existentes. Considerando a dificuldade de ampliação das áreas verdes em grandes metrópoles, como São Paulo, torna-se imprescindível realizar o monitoramento dos parques e áreas verdes existentes visando a realização de correções e melhorias na gestão deste importante patrimônio ambiental.

Parque Trianon

O parque Tenente Siqueira Campos, também conhecido como Trianon, situa-se na região sudeste (S 23.56183° X O 46.65798°). O Trianon é um dos mais antigos parques da cidade, tendo sido construído em 1910. Com área de 48.600 m² apresenta trilhas, viveiro de aves, parques, aparelhos de ginástica, pista de caminhada e de *corrida*. O parque contém 38 espécies de animais identificados, das quais 29 são de aves. Grandes exemplares vegetais representam a Mata Atlântica e no sub-bosque há espécies exóticas introduzidas, como: seafórtia e palmeira-de-leque-da-China, além de mudas de espécies nativas plantadas para enriquecimento florístico (Figura 3).



Figura 3. Foto aérea do Parque Trianon e indicação do local de coleta
(Segundo: <http://maps.google.com.br> distância de 50m)

Parque Horto Florestal

O Parque Horto Florestal fica localizado na zona norte da Capital (S 23.45950° X O 46.63217°) e ocupa área de 174 hectares. O parque possui fauna e flora diversificadas, palcos para eventos, área de piquenique, playground, pista de corrida, equipamentos de ginástica, bicas de água potável, lagos e o Museu Florestal (Figuras 4 e 5).

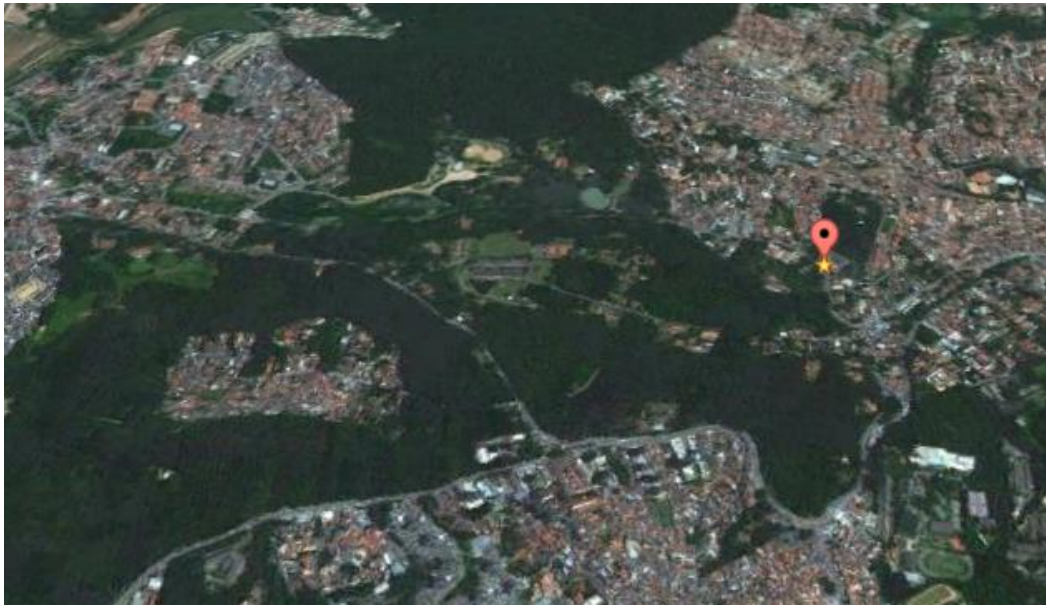


Figura 4. Foto aérea do Parque Horto Florestal
(Segundo <http://maps.google.com.br> distância de 200m)

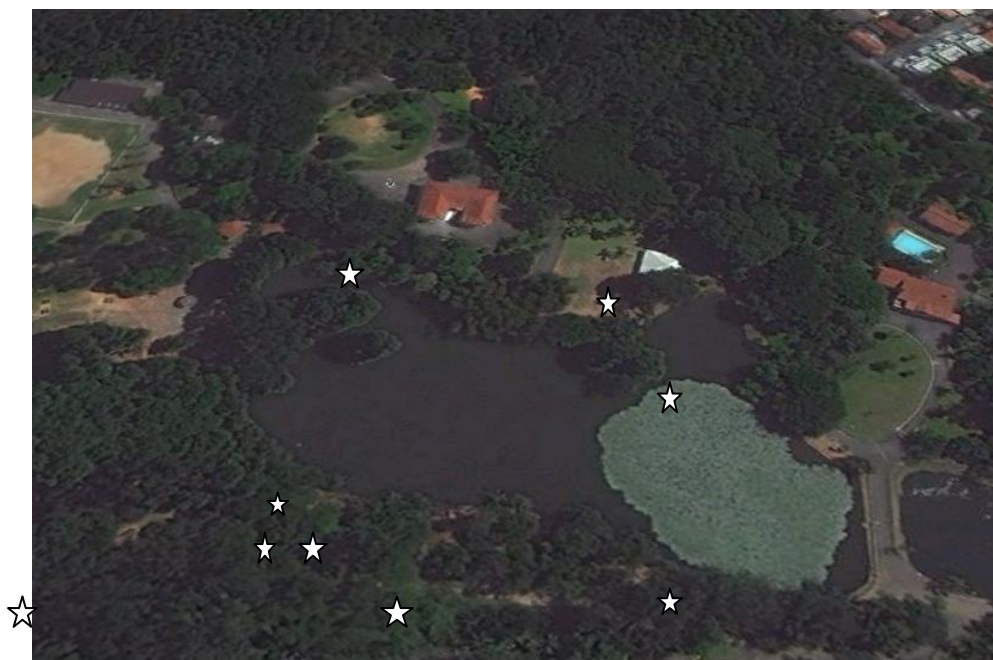


Figura 5. Foto aérea do Parque Horto Florestal e marcações dos pontos de coleta (Segundo <http://maps.google.com.br> distância de 50m)

Parque Ecológico do Tietê

O Parque Ecológico do Tietê, localizado na zona leste da capital (S 23.49879° X O 46.52841°). Esta área ocupa área de 14 milhões de metros quadrados, estendendo-se desde a barragem da Penha e São Miguel Paulista até o município de Guarulhos, servindo de bacia de acumulação de água do Rio Tietê para evitar enchentes na via Marginal da cidade de São Paulo. Considerado uma das grandes reservas ambientais do Estado, também é um grande laboratório de educação e cultura, em relação ao meio ambiente. O Parque conta com um Centro de Educação Ambiental, Centro Cultural, Museu do Tietê e Biblioteca. O parque possui um grande Centro de Recepção de Animais Silvestres, que abriga 2 mil animais apreendidos pelo Ibama, Polícia Florestal ou aqueles doados pela população (Figuras 6 e 7).



Figura 6: Foto aérea do Parque Ecológico do Tiete – Inteiro
(Segundo <http://maps.google.com.br> distância de 1km/2000 pés)



Figura 7. Foto aérea do Parque Ecológico do Tietê e indicação dos locais de coleta (Segundo <http://maps.google.com.br> distância de 50 m)

Parque Raposo Tavares

O parque Raposo Tavares, localizado na região centro-oeste (S 23.58660° X O 46.75560°) possui uma área de 195.000m². Nesta área verde é possível encontrar 31 espécies de aves. Como infraestrutura, o parque apresenta campo de malha, pista de *cooper*, *playground*, quadras poliesportivas, campo de futebol, sanitários, campinhos de terra, áreas de estar e aparelhos de ginástica. Como um parque construído sobre um aterro sanitário, apresenta, por isso, características peculiares: seu solo é formado por camadas compactadas, sendo revestido por uma camada de argila, para diminuir a emissão de gases, e por outra de terra que serve de substrato à vegetação (Figura 8).



Figura 8 Foto aérea do Parque Raposo Tavares e indicação dos locais de coleta. (Segundo <http://maps.google.com.br> distância de 1000m)

Associação Atlética Banco do Brasil

A Associação Atlética Banco do Brasil (AABB) fica localizada na zona sul da cidade (S 23.68668° x O 46.80317°). O parque, fundado há 77 anos, tem como área 110.000 m² abrigando árvores ornamentais e aves. A prática de esportes, bem como eventos sociais, educativos, culturais e esportivos resulta na presença semanal de 6000 usuários.

Esses 5 parques constituem áreas arborizadas distintas, com características diversas, incluindo tempo de formação, tipo de vegetação, distribuição de animais, ação antrópica, áreas construídas, entre outras. Estão localizadas nas 5 regiões da cidade de São Paulo e podem refletir a diversidade de clima e poluição encontrada na cidade. Os reservatórios naturais dos agentes de criptococose na cidade de São Paulo ainda estão por ser definidos e estudos devem ser realizados com objetivo de contribuir para

diminuir essa lacuna, fornecendo informações às autoridades sanitárias e aos cidadãos, da distribuição das diferentes espécies (Figura 09).



Figura 9. Foto aérea da Associação Atlética Banco do Brasil e indicação dos locais de coleta (Segundo <http://maps.google.com.br> distância de 100m)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento sobre ocorrência de leveduras do gênero *Cryptococcus* em ocos de árvores com injúria, localizadas em cinco parques públicos da cidade de São Paulo e em amostras de ar atmosférico no entorno das mesmas.

2.2 Objetivos específicos

Investigar ocorrência de espécies de *Cryptococcus* em parques da cidade de São Paulo, especificamente, em ocos de árvores e ar atmosférico adjacente às mesmas, por meio de 4 coletas ao longo de um ano;

Caracterizar os tipos moleculares dos isolados de *C. neoformans*;

Desenvolver um meio de cultura que facilite o isolamento de *Cryptococcus* de fontes ambientais, quantificando a presença de *Cryptococcus* spp. em amostras de oco de árvores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de Coleta

As coletas de material vegetal e ar atmosférico foram realizadas trimestralmente, durante período de um ano. As coletas foram feitas em 5 parques da cidade de São Paulo. Os parques foram escolhidos conforme a localização dentro da cidade de São Paulo, tendo como objetivo avaliar as 5 regiões (Figura 10).

No Parque Trianon, as amostras orgânicas foram coletadas das seguintes espécimes vegetais: cedro (n=1), quaresmeira (n=1), tapiá-guaçu (n=1), camboatá (n=1), araribás (n=3) e vinheiro (n=1). Um espécime não pode ser classificado taxonomicamente (n=1).

No Parque Horto Florestal, as amostras orgânicas foram coletadas das seguintes espécimes vegetais: canela gosmenta (n=1), quaresmeira (n=1), capororoca (n=1), ameixeira amarela (n=1), figueira (n=1), casuarina(n=1), jatobá(n=1), bico de andorinha(n=1) e tapiá-guaçu (n=1).

No Parque Ecológico do Tietê, as amostras foram coletadas das seguintes espécimes vegetais: quaresmeira (n=1), eucaliptos (n=2), aroeiras (n=2), gameleira (n=1), pinheiros (n=2) e pau-Brasil (n=1).

No Parque Raposo Tavares, as amostras foram coletadas das seguintes espécimes vegetais: espatódea (n=1), paineira (n=1), eritrina (n=1), jasmim (n=1), quaresmeira (n=1) e alfeneiros (n=4).

No parque da AABB, foram coletadas as seguintes espécimes vegetais: pitangueira (n=1), casuarina(n=1), eritrina(n=1), manacás da serra(n=2) e quaresmeiras (n=4).

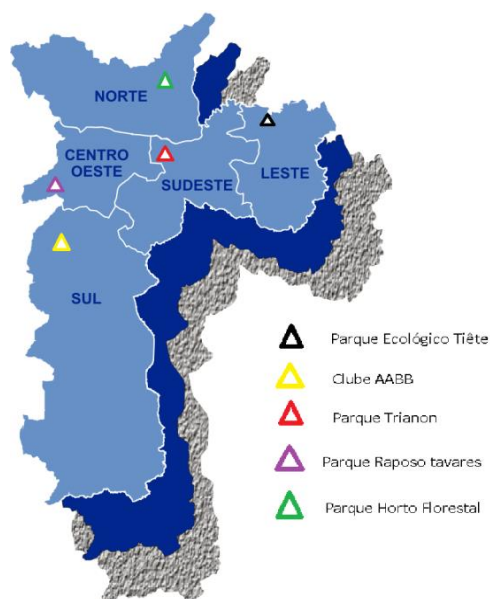


Figura 10. Localização dos parques, na cidade de São Paulo, onde foram realizadas as coletas de material vegetal e ar atmosférico.

3.2 Amostragem

Em cada um dos 5 parques, foram selecionadas 9 árvores que apresentavam injúrias em seu tronco. No período de outubro de 2010 a setembro de 2011 foram realizadas coletas trimestrais, sendo a primeira na primavera, a segunda no verão, a terceira no outono e a quarta no inverno. Para cada espécime vegetal foram coletadas 4 amostras de matéria orgânica retirada de dentro do oco (injúria) e 4 amostras de ar atmosférico no entorno da árvore. No total, foram obtidas 180 amostras de espécimes vegetais e 180 amostras de ar .

3.3 Identificações dos espécimes vegetais

Todos os exemplares arbóreos selecionados foram marcados e submetidos à coleta de material vegetativo (flor, fruto, casca, folha e semente) para identificação das espécies. A identificação taxonômica da maioria dos exemplares foi iniciada em campo, com base nos aspectos morfológicos das

espécies. O material botânico foi coletado e herborizado conforme Fidalgo e Bononi (1984). O sistema de classificação utilizado foi o *Angiosperm Phylogeny Group* II (Souza e Lorenzi, 2005) e, de modo complementar, os nomes científicos foram verificados e confirmados na “Lista de espécies da Flora do Brasil” (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2011). A identificação taxonômica foi realizada pelo Dr. Osni Tadeu Aguiar, taxonomista do parque Horto florestal de São Paulo.

3.4 Coleta e processamento de amostras ambientais

3.4.1 Coleta e processamento de matéria orgânica contida em ocos de árvores

A matéria orgânica do oco, de cada espécime vegetal escolhida, foi coletada (cerca de 50 g) com as mãos revestidas por luva descartável estéril. Ilustrações dos locais de coleta de todas as 45 espécimes vegetais amostradas constam das Figuras 11,12,13, 14 e 15)

Cada amostra foi armazenada em embalagem plástica, previamente, rotulada e, assim, encaminhada para o Núcleo de Micologia do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. No laboratório do Núcleo, 10 g de cada amostra foram suspensos em 40 mL de solução fisiológica estéril. Após agitação (2 minutos) em vórtex, a suspensão foi deixada em repouso por 10 minutos. Do sobrenadante, 8 mL foram aspirados com pipetas Pasteur e colocados em um tubo cônico, com tampa, contendo 2 mL de solução de penicilina cristalina 1.200.000 UI (4,5 mg/mL) e estreptomicina (10 mg/mL). Dessa suspensão, 100 µL retirados e semeados em estrias sobre a superfície de meio de cultura contido em placa de Petri (Figura 16).

A semeadura foi executada em 10 placas de Petri contendo meios de cultura, sendo 5 delas com ágar niger e 5 com ágar diclosan-rosa bengala modificado por adição de creatinina (DRBCm). O meio DRBCm foi preparado com uma infusão de 50 g de semente *Guizzotia absynnica* (sementes niger) em 1000 mL de água destilada contendo 2 g de creatinina p.a., adicionada a 15 g de ágar DRBC, comercialmente, formulado.



TAPIA GUAÇU 1



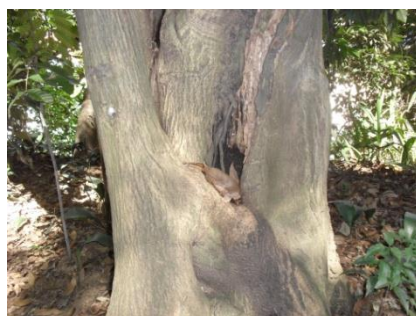
VINHEIRO 2



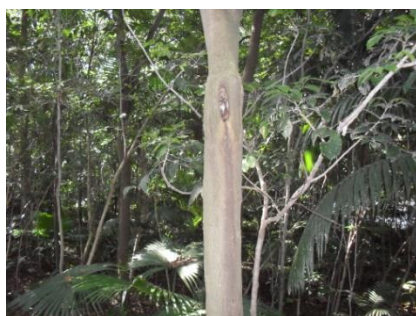
ARARIBA 3



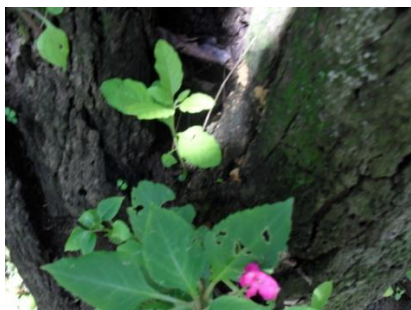
ARARIBÁ ROSA 4



CEDRO 5



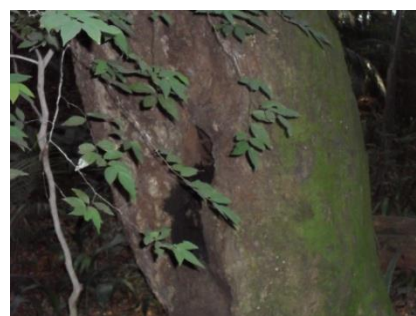
NI 6



QUARESMEIRA 7



CAMBOATÁ 8



ARARIBÁ ROSA 9

Figura 11. Ilustração dos espécimes vegetais amostrados no Parque Trianon com numeração dos exemplares.



CANELA GOSMENTA 1



QUARESMEIRA 2



CAPOROROÇA3



AMEIXA- AMARELA 4



FIGUEIRA 5



CASUARINA 6



JATOBÁ 7



BICO DE ANDORINHA 8



TAPIÁ GUAÇU 9

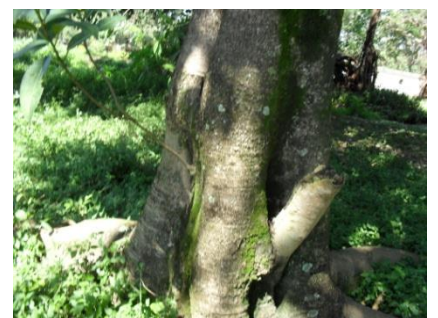
Figura 12. Ilustração dos espécimes vegetais amostrados no Parque Horto Florestais com numeração dos exemplares.



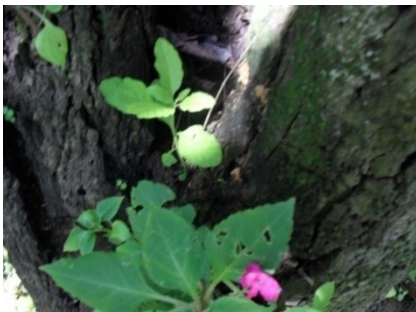
QUARESMEIRA 1



EUCALIPTO 2



AROEIRA 3



GAMELEIRA 4



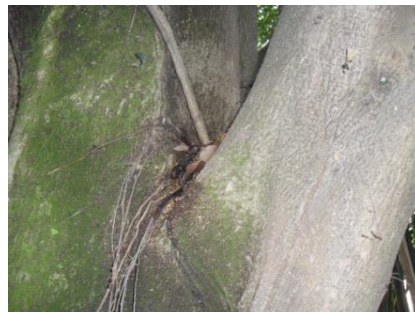
PINHEIRO 5



AROEIRA 6



PAU BRASIL 7



EUCALIPTO 8



PINHEIRO 9

Figura 13. Ilustração dos espécimes vegetais amostrados no Parque Tietê, com numeração dos exemplares.



ALFENEIRO



ESPATODIA



PAINEIRA



ALFENEIRO



ALFENEIRO



ERITRINA



JASMIM



QUARESMEIRA



ALFENEIRO

Figura 14. Ilustração dos espécimes vegetais amostrados no Parque Raposo Tavares com numeração dos exemplares.



QUARESMEIRA 1



QUARESMEIRA 2



QUARESMEIRA 3



PITANGUEIRA 4



MANACÁ DA SERRA 5



CASUARINA 6



ERITRINA 7



QUARESMEIRA 8



MANACÁ DA SERRA 9

Figura 15. Ilustração dos espécimes vegetais amostrados no Clube de Campo da Associação Atlética do Brasil, com numeração dos exemplares.

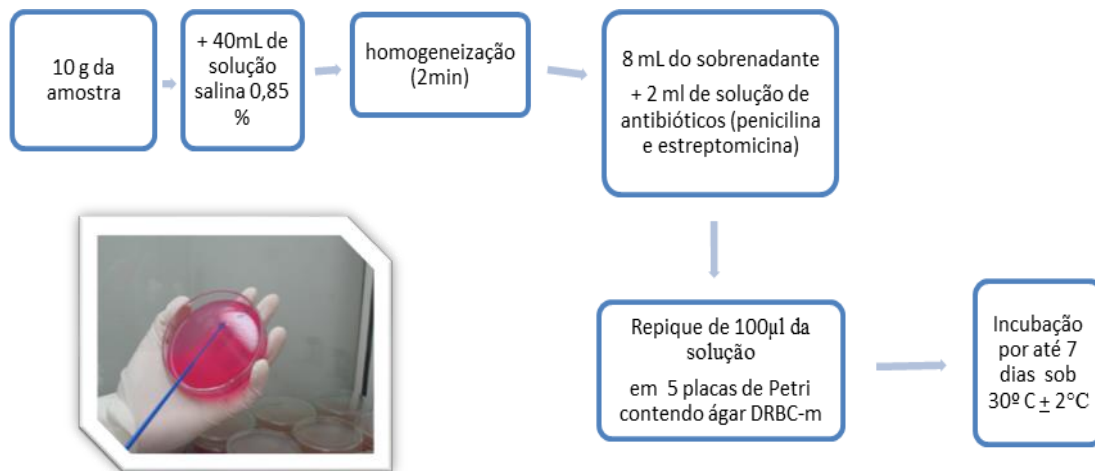


Figura 16. Esquema de processamento das amostras de ocos de espécimes vegetais

3.4.2 Coleta e processamento de ar atmosférico do entorno de árvores

As amostras de ar atmosférico foram coletadas com auxílio de impactador (*M air T*, Millipore, Bar) conforme ilustrado na Figura 17. Cada amostra, correspondendo a 250 l de ar, foi semeada diretamente pelo equipamento em placas contendo meio de cultura DRBCm).

3.5 Isolamentos de colônias de *Cryptococcus* spp.

As placas contendo os meios de cultura semeados com matéria orgânica e ar atmosférico foram incubadas à 30°C e observadas, diariamente, por até sete dias quanto ao crescimento de colônias de fungos (Nigro *et al.*, 1987; Machado *et al.*, 1993). Todas as colônias com aspecto cremoso, brilhante e pigmentada, ou não, características de leveduras, foram repicadas em tubos

contendo ágar niger e armazenadas sob 30°C, para identificação fenotípica (Figura 18).



Figura 17. Coleta de ar atmosférico com equipamento impactador

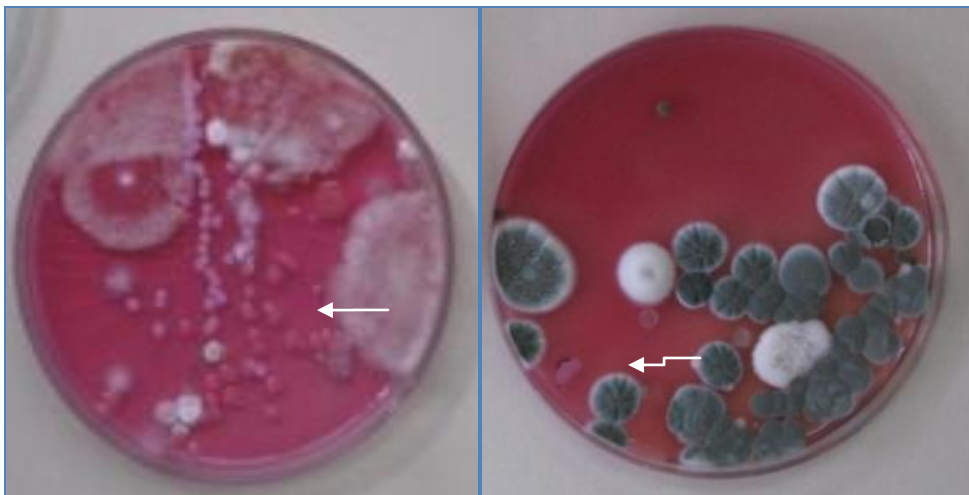


Figura 18. Colônias melanizadas características de *Cryptococcus* spp. (flechas) em meio DRBCm semeado com material de oco de jatobá.

3.6 Identificação laboratorial de *Cryptococcus* spp.

3.6.1 Purificação das culturas

Cada cultura obtida das amostras orgânicas e ar atmosférico foi plaqueada em ágar cromogênico (CHROMágar, Difco, EUA), mantido à 35°C por 48-72 h, para verificar sua pureza. Cada colônia pura foi, então, semeada em ágar Sabouraud com cloranfenicol. Cada cultura, assim obtida, constituiu um isolado para fins deste estudo.

3.6.2 Caracterização fenotípica

Para a caracterização fenotípica foram utilizadas culturas recentes (48 h a 25°C) obtidas em ágar Sabouraud com cloranfenicol. Todas as provas, com exceção da prova de assimilação, foram realizadas colocando-se uma pequena alçada da cultura nos diferentes meios e condições, descritos a seguir (Kwong - Chung, 1998).

Micromorfologia

A análise morfológica microscópica de cada isolado foi realizada por meio de montagem em duas lâminas: uma com corante lactofenol azul de algodão e outra com tinta da China. A análise foi feita ao microscópio ótico comum, sob aumento de 100 x e 400 x. A presença de cápsula foi confirmada pelo exame com tinta da China. A forma das células (globosas, arredondadas) foi analisada pelo corante azul. Estes aspectos, ao lado da observação anterior da melanização da colônia, observada em ágar niger, confirmaram o gênero *Cryptococcus* (Kwong - Chung, 1998).

Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio

Uma suspensão de cada isolado foi preparada, em solução fisiológica em turbidez igual ao tubo 2 da escala de Mc Farland. Os meios de cultura “C” (meio isento de fontes de carbono) e “N” (meio isento de fontes de nitrogênio) foram fundidos e deixados à temperatura ambiente até atingir temperatura de 40°C-45°C. Os meios fundidos, então, foram vertidos em placas de Petri 90 x 15 mm e sobre estes, foram adicionados 1 mL a 2 mL da suspensão de cada isolado. Após homogeneização e solidificação do ágar, foram adicionadas 16 fontes de carbono na superfície do meio “C” e 03 fontes de nitrogênio sobre o meio “N”. Após incubação a 25°C, por até 5 dias, foram anotadas na ficha de identificação a presença, ou ausência, de halo de crescimento ao redor de cada fonte de carbono ou nitrogênio, indicando assimilação, respectivamente, positiva ou negativa (Kwon-Chung, 1998).

Todos os isolados de *Cryptococcus* foram identificados, em paralelo, pelo sistema comercial Api 20 aux ® (bioMérieux, Fr) comparação dos resultados obtidos na metodologias de auxanograma.

Atividade de fenoloxidase

Todos os isolados de *Cryptococcus* foram analisados quanto à capacidade de produção de melanina, em ágar niger à 30°C por período de 7 dias. O desenvolvimento de colônias de coloração marrom foi considerado como resultado positivo (Kwon-Chung, 1998).

Atividade de urease

Todos os isolados de *Cryptococcus* foram semeados em ágar uréia de Christensen e mantidos a 25°C por até 5 dias. A reação foi considerada positiva quando o meio, contendo uréia, sofreu ação da enzima urease e mudou de cor, tornando-se rosa (Kwon-Chung, 1998).

Crescimento à temperatura de 37 °C

Todos os isolados de *Cryptococcus* foram semeados em ágar Sabouraud com cloranfenicol e mantidos à 37°C por até 4 dias. O crescimento indica capacidade de crescimento *in vitro* nessa temperatura (Kwon-Chung,1998).

Diferenciação fenotípica de C. neoformans e C. gattii

Todos os isolados de *Cryptococcus* foram semeados em tubo contendo ágar à base de L-canavanina, glicina e azul de bromotimol (ágar CGB), incubado a 25 °C por até 5 dias. O resultado positivo é indicado pela mudança de cor do ágar (verde) para cor azul-cobalto. Isto indica, de modo presuntivo, presença de *C. gattii*.

3.6.3 Experimentos para análise molecular

A análise molecular teve colaboração externa, tendo sido realizada por outros profissionais técnicos na área de biologia molecular. A análise foi aplicada em duas situações: i) cepas de *C. neoformans* para confirmação da espécie e determinação do tipo molecular, ii) cepas de *C. laurentii* para determinação de espécies crípticas.

Todos os isolados identificados, fenotipicamente, como *C. neoformans* foram analisados por técnica de biologia molecular (PCR e PCR-RFLP), no Instituto Adolfo Lutz com a colaboração da pesquisadora Marilena dos Anjos Martins, conforme a metodologia a seguir.

Fase pré-analítica para análise molecular de isolados de C. neoformans

A extração de DNA genômico foi realizada em duas etapas. Em princípio foi realizada a obtenção de protoplastos. Para tanto, algumas colônias com crescimento de até 48h, foram removidas para um microtubo tipo Eppendorf® contendo 1mL de EDTA 50 mM. Cada um dos microtubos foi centrifugado a

10.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e, ao sedimento, foi adicionado 1mL de EDTA 50 mM. Este processo de lavagem foi repetido até que o sobrenadante tenha ficado límpido, sendo então desprezado. Para a digestão da cápsula e parede celular, as células do sedimento foram ressuspensas em 200 μ L de tampão CES (20mM de tampão citrato, pH 5,6; 50mM de EDTA; pH 8,0; 0,9M de sorbitol), contendo 30 μ L de enzima lítica obtida de *Trichoderma harzianum* (Sigma, EUA). Para tanto, a suspensão foi incubada a 37 °C por 2 às 3h, sob agitação constante. A seguir, os microtubos contendo os protoplastos foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos, sob temperatura de 4°C. Foram feitas, em seguida, três lavagens do sedimento com 1mL de tampão CES e, então, o sedimento foi ressuspenso em 200 μ L de tampão CES (Branchini *et al.*, 1994 ; Shin *et al.*, 2001).

A seguir foi realizada a lise celular e, para tanto, aos protoplastos obtidos, foram adicionados 200 μ L a 300 μ L de tampão de lise. Após homogeneização em vórtex, o material foi aquecido em banho-maria à temperatura de 50°C por 2h, com agitação em vórtex a cada 30 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado por 5 minutos e o sobrenadante formado foi transferido para outro microtubo. Ao sobrenadante foram adicionados 200 μ L a 400 μ L de clorofórmio com isopropanol (24:1) para precipitação das proteínas. Após centrifugação por 15 minutos, houve a formação de três fases. A fase superior aquosa foi transferida para outro microtubo e para promover a precipitação do DNA, foram adicionados 300 μ L de isopropanol. O material foi centrifugado, por 10 minutos a 10.000 rpm, e o sobrenadante foi desprezado. Ao sedimento foram adicionados 200 μ L a 500 μ L de etanol 70%. Após centrifugação, por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado. Após secagem do sedimento, contendo DNA, o mesmo foi ressuspenso em 50 μ L de água Mili Q (Millipore, Br) e mantido em sob -20°C até sua utilização (Sambrook *et al.*, 1989).

Fase analítica para análise molecular de isolados de C. neoformans

Para verificar e confirmar a eficiência da extração, as amostras de DNA genômico foram submetidas à eletroforese em gel de ágarose (2%) e coradas com brometo de etídio. A presença de banda, confirmatória da presença de DNA, foi observada em transiluminador em comprimento de onda 302 nm.

Para a quantificação de DNA genômico, as amostras foram diluídas (1:200) em água deionizada estéril (Milli Q, Millipore, Br) e medida sua absorbância, com comprimento de onda de 260 e 280 nm (luz ultravioleta), em espectrofotômetro (HACH DR 4000U, EUA). O grau de pureza das extrações foi determinado pela razão entre as leituras de densidade ótica (DO) de 260/280.

Para a amplificação da seqüência-alvo do DNA de *Cryptococcus*, por técnica de PCR segundo descrito por Meyer *et al.* (2003), foi utilizada a solução *Go Taq® Green Master Mix* (Promega, Br). Esta solução contém *Taq* DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões para amplificação do DNA. As soluções contém 2 corantes que permitem monitorar o curso da eletroforese e sua densidade é suficiente para que o produto da PCR seja aplicado, diretamente, no gel.

Para a técnica de PCR-RFLP, foi amplificado o fragmento *URA5* utilizando-se par de *primers* URA5(5'- ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG-3') e Sj01(5'-TTAAGACCTCTCTGAACACCGTACTC-3'), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5', 35 ciclos a 94 °C por 45 seg; à 63°C por 1minuto; a 72 °C por 2 minutos e extensão final de 10minutos a 72 °C. Os produtos do PCR foram digeridos duplamente por *HhaI* (20 U/ulo) e *Cfr13I*, isômero de *Sau96I* (10U/ulo) por 3 h.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em sistema horizontal contendo TBE durante 40 minutos a 100V e 400mA. Os géis foram, então, observados em transiluminador (Synge e) com luz ultravioleta a 302 nm. Os perfis de bandas das cepas foram observados e documentados e, por comparação com os perfis das cepas de referência. Para os experimentos de biologia molecular, foram usadas 4 cepas-padrão de *C. neoformans* dos tipos moleculares VNI, VNII, VNIII e VNIV, gentilmente cedidas por Dr. Wieland Meyer para a Fundação Oswaldo Cruz e repassadas para o Núcleo de

Micologia do Instituto Adolfo Lutz. Foi confirmada, assim a espécie, bem como definido o tipo molecular dos isolados de *C. neoformans*.

Determinação de espécies crípticas do complexo C. laurentii por sequenciamento da região D1/D2 LSU do rDNA

Após identificação fenotípica de *C. laurentii*, as cepas foram encaminhadas para Universidade Federal de Uberaba, MG, Br (UFU) onde foram sequenciadas pelo grupo do Prof. Dr. Mário Leon Vergara-Silva, conforme a metodologia descrita a seguir.

As reações foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo 10ng de DNA molde, 5 µL do tampão de PCR 1x (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 0,1%, 1,5mM de MgCl₂), 0,25 mM dos nucleotídeos dNTP's (dATP, dCTP, dGTPe dTTP), 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN) e 70 picomol de cada iniciador. As sequências dos iniciadores foram: NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). As reações de PCR foram realizadas em termociclador PT-100 (MJ Research Inc., MA, EUA), obedecendo aos seguintes critérios: desnaturação inicial a 94 °C (3 minutos) seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94 °C (30"), associação a 57 °C (30seg), extensão a 72 °C (45seg) e ciclo final de extensão de 10 minutos a 72 °C (Sugita *et al.*, 2000; Takashima *et al.*, 2003).

Os produtos de amplificação foram analisados, após corrida eletroforética em gel de ágarose 1,5% (INVITROGEN) em tampão TAE 1x a 90 volts por 2 h. Foram utilizados 5 µL do produto amplificado, diluídos em igual volume de tampão de amostra 2x (azul de bromofenol 0,5%, xileno-cianol 0,5%, glicerol 60%), aplicados em paralelo em canaletas, usando-se marcador de peso molecular de 100pb (BIONNER, EUA). Terminada a corrida, o gel foi corado por imersão em 500 mL de solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL por 30 minutos) e, parcialmente, descorado por imersão em igual volume de água destilada, durante o mesmo tempo. Os fragmentos de DNA foram visualizados em foto documentador (VERSA DOC, BIO-RAD®) com filtro específico

(Ferreira-Paim *et al.*, 2011).

Purificação do produto amplificado de fenótipos de C. laurentii

O produto amplificado foi purificado e acrescido de acetato de sódio (3M, pH 5,2) na proporção de 1:10. A solução obtida foi homogeneizada por agitação manual. Em seguida, foram adicionados, homogeneizando-se delicadamente, 40 µL de etanol absoluto refrigerado, e armazenado a -20 °C por 30 minutos. A amostra obtida foi centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e, ao produto restante, foram adicionados 80µL de etanol 70% e, novamente, centrifugado a 14000 rpm, por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, o produto foi secado à temperatura ambiente e ressuspensão em 20 µL de água deionizada, antes de ser refrigerado à temperatura de -20 °C. O produto obtido foi quantificado em gel de ágarose após comparação com amostra de DNA controle (*LOW DNA MASS LADDER*, INVITROGEN, EUA).

Reação de sequenciamento de fenótipos de C. laurentii

O sequenciamento foi realizado com volume final de 20mL. Foram adicionados 2mL de *Big Dye Mix* (*Kit Big Dye Terminator*, versão 3.1, Applied Biosystems), 3mL do tampão de sequenciamento 5X, 3,2 pmoles/reacção do iniciador, além de 20ng de produto amplificado. Cada fragmento foi sequenciado, independentemente, utilizando-se o iniciador direto e outra com um iniciador reverso. A PCR foi realizada em termociclador (*MY CYCLER*, BIO RAD, EUA), obedecendo aos seguintes critérios: desnaturação inicial a 96 °C (1minutos) seguido de 35 ciclos com desnaturação a 96 °C (10-15 segundos), associação a 50 °C (5-15 segundos), extensão a 60°C. Após a termociclagem, a placa foi armazenada na geladeira, em temperatura de 4°C a 8°C, ou freezer, à temperatura de -20°C, sempre protegida da luz para evitar degradação das fluorescências (*KIT PROTOCOL*, APPLIED BIOSYSTEMS, EUA).

Precipitação do produto sequenciado de fenótipos de C. laurentii

Foram acrescentados 5mL de EDTA 125 mM e 60mL de etanol 100% em cada tubo, homogeneizados e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos. Os tubos foram centrifugados a 3000 g por 30 minutos. Após a secagem completa à temperatura ambiente foram adicionados 60mL de etanol 70%, centrifugado novamente a 1650 g a 4 °C por 15 minutos. Após a secagem completa dos tubos, as amostras foram ressuspensas em 10mL de formamida HiDi (tampão de injeção), cobertas com selante de alumínio e estocadas a 4°C até a leitura do sequenciamento no analisador automático de DNA *ABI PRISM 3100* (Applied Biosystems, EUA).

Análise dos dados de fenótipos de C. laurentii

As sequências foram editadas, manualmente, utilizando-se o *software Sequence Scanner* (Applied Biosystems, EUA). A sequência consenso de cada cepa foi criada por meio de alinhamento da sequência originada com o iniciador direto e o reverso e complemento da sequência do originado com o iniciador reverso. O alinhamento múltiplo foi realizado por meio do *software Clustal W*. Após o alinhamento, a comparação filogenética foi realizada utilizando-se o *software MEGA 5.0* (Ferreira-Paim *et al.*, 2012).

3.7 Avaliação do desempenho do meio DRBC m

O desempenho do meio DRBCm, como novo meio para isolamento de *Cryptococcus* spp. a partir de amostras ambientais, foi avaliado frente ao meio clássico de ágar niger. Para tanto, foram realizados 2 procedimentos executados em duplicata:

a) comparação da contagem de colônias (ufc/mL) obtidas de material orgânico positivo para *Cryptococcus* spp. nos meios DRBCm e ágar Niger. Para este ensaio foram empregadas 2 amostras orgânicas coletadas de ocos das espécimes vegetais: *Hymenaea courbaril* e *Legustrum* spp. A primeira amostra

continha baixa concentração (1×10^2 ufc/mL) e a segunda alta concentração de colônias (2×10^4 ufc/mL) de *Cryptococcus* spp. A contagem de unidades formadoras de colônias de fungos filamentosos e leveduras não produtoras de melanina, presentes nas amostras foi também realizada. Para tanto, 5 g de cada amostra positiva foi resuspensa em 20 mL de solução salina 0,85%, homogeneizada em vortex por 5 minutos a 150 rpm e centrifugada. Oito mL do sobrenadante foi retirado e adicionado a 2 mL de solução de antibióticos (estreptomicina e penicilina (4,5 mg/mL e 10 mg/mL, respectivamente). A suspensão resultante foi, então, mantida a 20 minutos para descontaminação bacteriana. Após esse período, 10 μ L foi semeado na superfície de meio de cultura contido em placa de Petri. Foram usadas 5 placas contendo ágar niger e 5 com ágar DRBCm. Após incubação por 7 dias a 30°C foi feita a contagem de ufc/mL. Um contador de colônia (Phoenix, Br) foi usado para contagem das colônias melanizadas (com características de *Cryptococcus* spp.), colônias hialinas leveduriformes e colônias de fungos filamentosos em cada placa. A média geométrica de ufc/mL, para cada tipo de micro-organismo, obtida em cada um dos dois meios de culturas empregados foi calculada. Todas as colônias melanizadas foram avaliadas quanto à micro morfologia e presença de cápsula, antes da compilação dos dados.

b) avaliação do limite de detecção de colônias em material orgânico negativo inoculado com suspensão de *C. neoformans*. Para essa finalidade foram empregadas 5 concentrações de células da levedura que foram inoculadas em 5 alíquotas de material orgânico de oco de árvore com resultados negativos para *Cryptococcus* spp. As seguintes concentrações foram preparadas: 10 ufc/mL, 10^2 ufc/mL, 10^3 ufc/mL, 10^4 ufc/mL e 10^5 ufc/mL. Para isso, foi preparada uma suspensão de 10^6 ufc/mL, em 2 mL de solução salina 0,85%, a partir de cultura de 24 h de *C. neoformans* (ATCC 900012). Um mL dessa suspensão foi adicionado a um tubo contendo 9 mL de solução salina 0,86% para preparar concentração de 10^5 ufc/mL e, assim, sucessivamente para o preparo do gradiente de concentrações. Um alíquota de 1 mL de cada tubo, contendo cada uma das 5 concentrações, foi agregada a tubos com 9 mL de solução salina contendo 5g de matéria. A partir desses tubos foram retiradas alíquotas de 10 μ L que, então, foram semeadas em ágar DRBCm e niger,

sendo 3 placas de cada meio de cultura. Após incubação por 7 dias a 30°C foi feita a contagem de ufc/mL com auxílio de contador de colônias (Phoenix, Br). A média geométrica (ufc/mL) foi calculada para cada um dos dois meios de culturas empregados. Todas as colônias melanizadas foram avaliadas quanto à micro morfologia e presença de cápsula, antes da compilação dos dados.

4. RESULTADOS

As 4 coletas realizadas, durante o período de um ano, permitiram obter 180 amostras de espécimes vegetais. Estas amostras, semeadas em 5 placas com meio DRBCm e 5 placas com ágar niger, resultaram em 1800 placas de Petri, todas elas apresentando crescimento fúngico, seja de leveduras (melanizadas e não melanizadas), seja de fungos filamentosos. De modo simultâneo, foram coletadas 180 amostras de ar atmosférico, que resultaram em 180 placas com ágar DRBCm, todas elas apresentando crescimento de fungos diversos.

Quanto ao isolamento de colônias de *Cryptococcus* (Figura 19), os procedimentos permitiram verificar a presença de leveduras desse gênero em todos os 5 parques amostrados. Foram obtidos 123 isolados de *Cryptococcus* spp., incluindo 111 (90,2%) provenientes de ocos de espécimes vegetais e 12 (9,8%) isolados de ar atmosférico adjacente. Ainda que a melanização das colônias primárias tenha variado de intensidade conforme o isolado (Figura 20), todas foram classificadas dentro do gênero *Cryptococcus*. Os Apêndices 2, 3, 4, 5 e 6 mostram os resultados de isolamento de *Cryptococcus* spp., de acordo com o parque amostrado, nome (científico e popular) do espécime vegetal e seu país de origem, estação do ano e tipo de amostra coletada. Todos os isolados foram identificados em gênero e espécie por métodos fenotípicos, com exceção de 1 isolado de ar atmosférico e 7 de material contido em oco, cujas espécies não puderam ser estabelecidas com as metodologias empregadas neste estudo. Esses isolados constam, portanto, sem a espécie nos Apêndices citados.

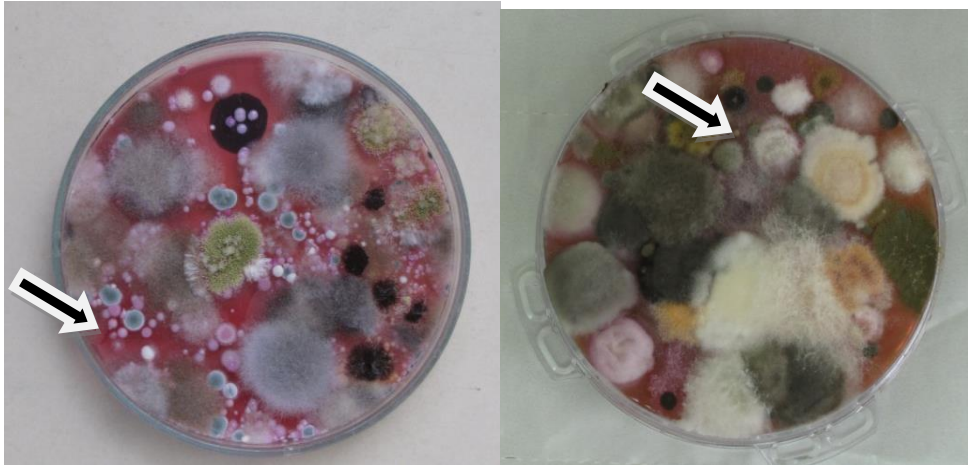


Figura 19. Placas de Petri, contendo meio DRBCm, com crescimento de colônias de *Cryptococcus* (setas) em meio a desenvolvimento abundante de outras leveduras e fungos filamentosos.

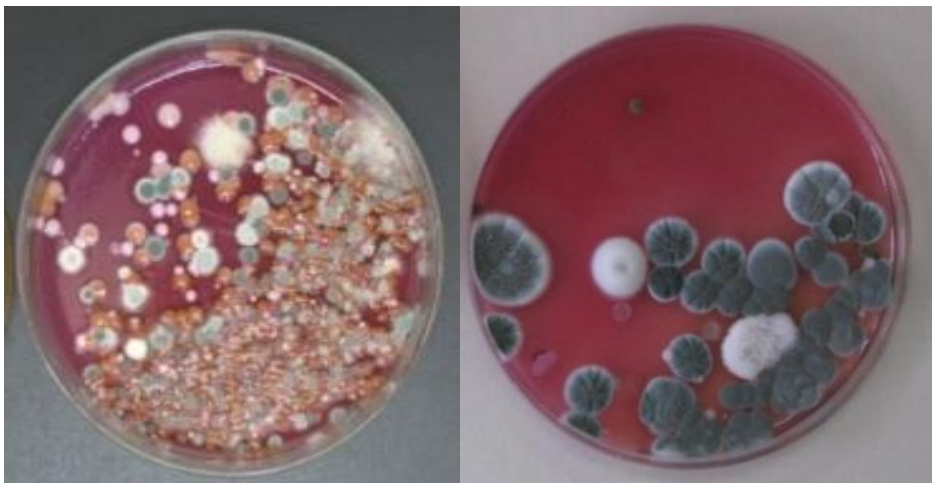


Figura 20. Placas de Petri contendo meio de DRBCm ilustrando colônias primárias de isolados de *Cryptococcus* spp. com maior (esquerda) e menor (direita) produção de melanina após 7 dias de incubação a 25°C.

Dentre os 45 exemplares de espécimes vegetais, 20 mostraram-se positivos para a presença *Cryptococcus* spp. em seu oco. Das 25 espécies amostradas, 19 foram positivas para *Cryptococcus*, como segue: *Alchornea sidifolia* (tapiá-guaçu), *Araucária angustifolia* (pinheiro), *Astronium flaxinifolium* (aroeira), *Casuarina equisetifolia* (casuarina), *Cedrela fissilis* (cedro), *Centrolobium tomentosum* (araribá rosa), *Eritrina speciosa* (eritrina), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Hymenaea courbaril* (jatobá), *Gryobotria japônica* (ameixa amarela), *Ligustrum japonicum* (alfeneiro), *Machoenium nictitans* (bico de andorinha), *Ocatea puberula* (canela gosmenta), *Plumeria rubra* (jasmim), *Rapanea umbellata* (capororoca), *Spathodea campanulata* (quaresmeira), *Tibouchina granulosa* (quaresmeira), *Tibouchina mutabilis* (manacá da serra) e *Vochysia tucanorum* (vinheiro) (Tabela 1).

Diversas espécies de *Cryptococcus* foram verificadas nas amostras e, entre elas, a de maior importância médica, *C. neoformans*, foi identificada em 68 isolados. Essa espécie foi encontrada apenas em material do oco, não tendo sido obtido de ar atmosférico. O espécime vegetal que albergava *C. neoformans* foi *Hymenaea courbaril* (jatobá). A identificação molecular por PCR/RFLP de todos os isolados de *C. neoformans* permitiu verificar que pertenciam ao genótipo VNI. Uma ilustração do gel mostrando o perfil desse tipo molecular consta da Figura 21.

A segunda espécie mais encontrada foi *C. laurentii*, cujas frequências serão apresentadas segundo tipo de amostra. Por meio da parceria com pesquisadores da Universidade de Uberaba, foi possível o sequenciamento dos fenótipos de *C. laurentii* que permitiu a reclassificação em: *C. flavescens*, *C. terrestris* e *C. laurentii stricto sensu*. Os resultados foram apresentados no Congresso Internacional de Micologia Humana e Animal, Berlim, 2012 (Anexo 1).

Desse modo, as espécies de *Cryptococcus* encontradas em ocos de árvores foram assim distribuídas: *C. neoformans* (61,3%; 68/111), *C. laurentii* (24,3%; 27/111), *C. albidus* (6,3%; 7/111) e *C. terrestris* (1,8%; 2/111). Em 7 (6,3%; 7/111) a espécie de *Cryptococcus* não pode ser identificada pelos métodos empregados no estudo. Em uma das amostras positivas para *C. neoformans* foi verificada presença concomitante de *C. albidus* (Apêndice 3,

isolado I271A).

As amostras de ar com resultados positivos para *Cryptococcus* spp. foram correspondentes a 8 espécimes vegetais, a saber: *Alchornea sidifolia* (tapiá-guaçu), *Eritrina speciosa* (eritrina), *Hymenaea courbaril* (jatobá), *Gryobotria japônica* (ameixa amarela), *Machoenium nictitans* (bico de andorinha), *Ocatea puberula* (canela gosmenta), *Tibochina granulosa* (quaresmeira) e *Tibouchina mutabilis* (manacá-da-serra) (Tabela 1).

Nas 10 amostras de atmosférico positivas para o gênero *Cryptococcus* foram obtidos 12 isolados de *Cryptococcus*. As amostras de ar atmosférico positivas foram provenientes de 4 dos 5 parques amostrados e continham as seguintes espécies: *C. laurentii* (66,8%; 8/12), *C. albidus* (8,3%; 1/12), *C. humicola* (8,3%; 1/12), *C. flavescens* (8,3%; 1/12). Em 1 (8,3%; 1/12) isolado a espécie não pode ser identificada pelos métodos empregados.

Os resultados de ocorrência de isolados de *Cryptococcus* spp., em amostras de ocos de troncos de espécimes vegetais e em amostras de ar atmosférico circundantes aos mesmos, constam da Tabela 2.

Tabela 1. Ocorrência de *Cryptococcus* spp. em ocos de 20 exemplares de 19 espécies e 10 amostras de ar circundante de 9 espécies, localizados em 5 parques da cidade de São Paulo, Brasil

Espécimes vegetais (nome popular)	Número espécimes / amostras de ar					Total
	Parque	Parque	Parque	Parque	Parque	
	1	2	3	4	5	
<i>Alchornea sidifolia</i> (tapiá-guaçu)	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1
<i>Araucária angustifolia</i> (pinheiro)	0/0	0/0	01/0	0/0	0/0	1/0
<i>Astronium flaxinifolium</i> (aroeira)	0/0	0/0	01/0	0/0	0/0	1/0
<i>Casuarina equisetifolia</i> (casuarina)	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0
<i>Cedrela fissilis</i> (cedro)	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
<i>Centrolobium tomentosum</i> (araribá rosa)	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
<i>Eritrina speciosa</i> (eritrina)	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	1/1
<i>Eucalyptus</i> spp. (eucalipto)	0/0	0/0	01/0	0/0	0/0	1/0
<i>Hymenaea courbaril</i> (jatobá)	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	1/1
<i>Gryobotria japônica</i> (ameixa amarela)	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	1/1
<i>Ligustrum japonicum</i> (alfeneiro)	0/0	0/0	0/0	4/2	0/0	4/2
<i>Machoenium nictitans</i> (bico de andorinha)	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	1/1
<i>Ocatea puberula</i> (canela gosmenta)	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/1
<i>Plumeria rubra</i> (jasmim)	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	1/0
<i>Rapanea umbellata</i> (capororoca)	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	1/0
<i>Spathodea campanulata</i> (espatódea)	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	1/0
<i>Tibouchina granulosa</i> (quaresmeira)	0/0	0/0	0/0	1/1	1/0	2/1
<i>Tibouchina mutabilis</i> (manacá-da-serra)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/1
<i>Vochysia tucanorum</i> (vinheiro)	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0
Total	03/01	04/04	03/0	08/04	02/01	20/10

Parques: 1, Trianon; 2, Horto florestal; 3, Tietê; 4, Raposo Tavares; 5, Associação Atlética Banco do Brasil

Tabela 2. Distribuição de espécies identificadas em isolados ambientais de *Cryptococcus* spp., segundo tipo de amostra coletada em parques da cidade de São Paulo, Br

Amostra	Material de oco de tronco	Ar atmosférico	Total de isolados
<i>C. neoformans</i>	68	0	68
<i>C. laurentii</i>	27	8	35
<i>C. albidus</i>	7	1	8
<i>C. humicola</i>	0	1	1
<i>C. terrestris</i>	2	0	2
<i>C. flavescens</i>	0	1	1
Não identificada	7	1	8
Total de isolados	111	12	123

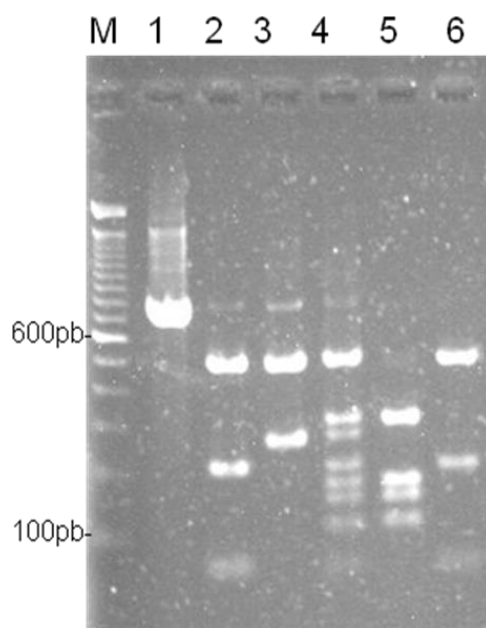


Figura 21. Gel de agarose 2% com técnica de eletroforese aplicada a cepas de *C. neoformans*, onde: M, marcador de peso molecular(100pb): linha 1 PCR, linha 2, 3, 4 e 5, cepas-padrão, respectivamente, tipo molecular VNI, VNII, VNIII, VNIV; linha 6 exemplo de perfil molecular (VNI) de 68 amostras isoladas de oco de tronco de *Hymenea carbaril*.

Quando comparadas as espécies de *Cryptococcus*, encontradas no oco e no ar adjacente, verificou-se que em 5 coletas (50%, 5/10) elas foram equivalentes. A espécie *C. laurentii* foi obtida nessas 5 coletas que estavam relacionadas aos espécimes: *Grybotria japônica* (exemplar 4) e *Machoenium nictitans* (exemplar 8) do Parque Horto Florestal, *Eritrina speciosa* (exemplar 6), *Tibochina granulosa* (exemplar 8), *Ligustrum japonicum* (exemplar 9) do Parque Raposo Tavares.

Neste estudo, foi analisado ainda a ocorrência de isolados de *Cryptococcus* em amostras coletadas a cada 3 meses dos mesmos locais, equivalendo a uma coleta a cada estação do ano. Os resultados com amostras de material coletado em ocos de espécimes vegetais mostraram que 47,9% (59/123) dos isolados foram obtidos no verão, 21,1% (26/123) no outono, 13% (3/123) na primavera e 9,8% (12/123) no inverno. Os isolados de *C. neoformans* foram observados em 3 estações do ano: verão (79,4%), inverno (38,2%) e outono (4,4%).

A análise feita em relação aos isolados de *Cryptococcus* provenientes de ar atmosférico mostrou que os resultados positivos ocorreram no inverno (58,3%; 7/12 isolados) e no verão (41,7%; 5/12 isolados).

Os resultados da avaliação de desempenho do meio DRBCm para isolamento de *Cryptococcus* spp. mostraram que esse meio proporcionou o crescimento de 123 isolados, enquanto o ágar niger permitiu desenvolvimento de 20 isolados. As Tabelas 3 e 4 mostram as contagens de colônias de *Cryptococcus* spp. realizadas em 5 placas contendo os meios DRBCm e ágar niger e respectivas médias. A Tabela 3 refere-se aos resultados obtidos com amostra vegetal contendo alta carga de *Cryptococcus*. Nela constam os valores obtidos em cada uma das 5 placas semeadas, com cada meio de cultura Além disso, são informadas as médias geométricas de contagem de colônias, respectivamente, no meio DRBCm e ágar niger, foram: $1,8 \times 10^4$ ufc/mL e $1,3 \times 10^4$ ufc/mL para leveduras não melanizadas, $0,25 \times 10^4$ ufc/ mL e $0,08 \times 10^4$ ufc/mL para leveduras melanizadas e de $2,2 \times 10^4$ ufc/mL e $0,92 \times 10^4$ ufc/mL para fungos filamentosos. Do mesmo modo, a Tabela 4 mostra os resultados obtidos com a amostra vegetal contendo baixa carga de *Cryptococcus* spp..

Observa-se que a média geométrica de colônias de leveduras melanizadas foi de $0,6 \times 10^4$ ufc/mL para DRBCm e que não houve crescimento desses fungos no meio de ágar niger. Fungos filamentosos tiveram distribuição de $0,87 \times 10^4$ ufc/mL e $0,91 \times 10^4$ ufc/mL nos meios DRBCm e ágar niger, respectivamente. Leveduras não melanizadas não foram observadas nesse experimento em ambos os meios empregados.

O estudo para determinação do limite de detecção de colônias de *C. neoformans*, permitiu verificar valor de 10^2 ufc/mL para o meio DRBCm e 10^4 ufc/mL para o ágar niger. A Tabela 5 mostra os resultados de detecção de colônias no meio DRBCm em relação ao ágar niger, segundo as distintas concentrações fúngicas empregadas no teste.

Tabela 3. Contagem (ufc/mL) de leveduras melanizadas (LM), leveduras não-melanizadas (LNM) e fungos filamentosos (FF) em material de oco vegetal contendo alta carga de *Cryptococcus* spp., de acordo com o meio de cultura utilizado

Placa	DRBC m			niger		
	LM	LNM	FF	LM	LNM	FF
01	184	40	216	180	10	64
02	154	35	220	120	04	80
03	180	15	150	200	10	95
04	200	35	300	100	5	106
05	220	0	180	89	10	115
Média						
UFC/mL	187,6	25	213,2	137,8	7,8	92

Tabela 4. Contagem (ufc/mL) de leveduras melanizadas (LM), leveduras não-melanizadas (LNM) e fungos filamentosos (FF) em material de oco vegetal contendo baixa carga de *Cryptococcus* spp., de acordo com o meio de cultura utilizado

Placa	DRBCm			niger		
	LM	LNM	FF	LM	LNM	FF
01	0	0	86	0	0	59
02	1	0	31	0	0	25
03	0	0	125	0	0	130
04	3	0	94	0	0	174
05	0	0	152	0	0	100
Média	0,8	0	97,6	0	0	97,6

DRBCm, meio Dicloram Rosa Bengala modificado

Tabela 5. Limite de detecção do DRBCm em relação ao niger para isolamento de *Cryptococcus neoformans*

ufc/mL	Contagem (ufc/mL)	
	DRBCm	niger
10^5	1.5×10^3	0.5×10^3
10^4	0.8×10^3	0.1×10^3
10^3	0.4×10^3	0
10^2	0.1×10^3	0
10^1	0	0

5. DISCUSSÃO

Os agentes principais da criptococose são encontrados em ambientes naturais, tais como: solos contaminados com excrementos de aves (particularmente, *C. neoformans*) e em matéria orgânica vegetal (principalmente, *C. gattii*). As partículas infectantes desses agentes podem ser aerolizadas e inaladas por seres humanos e animais, dando início à infecção subclínica ou clínica. Assim sendo, parques são locais que apresentam condições para a manutenção de espécies dos agentes da criptococose e, os parques situados em regiões urbanas representam locais visitados por indivíduos passíveis de infecção. Apesar da importância, na cadeia epidemiológica de criptococose de parques urbanos, estudos sobre a ocorrência dos agentes dessa doença nesses locais são ainda raros segundo literatura consultada (Lockhart *et al.*, 2012). Na literatura brasileira apenas um trabalho na cidade de São Paulo indicou a presença de *C. neoformans* em material orgânico originário do Parque do Ibirapuera, reforçando a relevância do tema e comprovando a carência de dados nesta cidade (Montenegro e Paula, 2000).

As pesquisas ambientais sobre *Cryptococcus* devem se estender a locais que ainda não foram explorados, no sentido de contribuir para melhor compreensão da ecologia desses agentes. Além disso, a busca contínua de espécies patogênicas ao homem em nichos ambientais serve como subsídio para estudos que visam analisar mecanismos adaptativos desses agentes que possam resultar em maior virulência e/ou resistência a antifúngicos com implicação clínica. Assim, este estudo surgiu pela preocupação de analisar fontes ambientais dos agentes da criptococose em áreas recreacionais na cidade de São Paulo.

A escolha dos 45 exemplares de espécimes vegetais, dentro dos parques, foi de acordo com a presença de oco em seu tronco. A escolha do oco foi aleatória, independente do tamanho e posição do mesmo. Não foi objeto deste estudo avaliação de fatores críticos (insolação, luminosidade, umidade, pH, presença de insetos, estado de decomposição, entre outros) que poderiam interferir na presença e manutenção de isolados de *Cryptococcus* spp. nesses locais. As fotos dos exemplares servem, de outro modo, para

ilustrar os pontos de coleta e servir, talvez, de subsídio para futuros estudos analíticos.

A presença de *C. neoformans* em ocos de diferentes espécies de árvores sugere que as árvores poderiam ser um *habitat* natural. Os resultados obtidos neste estudo, indicando a presença de *Cryptococcus* spp. em 19 espécies vegetais distintas reforçam que a associação entre *Cryptococcus* e espécimes vegetais acontece sem especificidade, sugerindo que a disponibilidade de matéria orgânica oferecida para o fungo representa a base fundamental para sua presença. Esta observação foi, previamente, feita por Reimão e colaboradores (2007) que consideraram a disponibilidade de matéria orgânica, além do tipo de injúria presente no vegetal, como fatores preponderantes para a presença de *Cryptococcus* spp.

Em relação às espécies de árvores que foram associadas com presença de *Cryptococcus* há, na literatura brasileira, espécies já relatadas, como *Eucalyptus* (Refojo *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2005) O único trabalho publicado que se refere a parques da cidade de São Paulo foi o estudo de Montenegro e Paula (2000) que investigaram a presença de *Cryptococcus* nos seguintes locais: Aclimação, Ibirapuera, Parque do Carmo e Piqueri. Os autores lograram o encontro de *C. neoformans*, *C. gatti* e *C. laurentii* em serrapilheira próximo a *E. camaldulensis* e outras espécies de eucaliptos. Solo e serrapilheira podem conter substâncias que estimulam o desenvolvimento do fungo, como: creatinina, inositol e ácido indol-acético.

Alguns resultados obtidos neste estudo coincidem com outros trabalhos que verificaram *Cryptococcus* em árvores dos gêneros: *Cassia* e *Ficus* (Lazéra *et al.*, 2000), *Ligustrum* e *Tibouchina* (Reimão *et al.*, 2007; Baltazar e Ribeiro 2008) e *Pinus* spp. (Baltazar e Ribeiro, 2008).

Interessante que, de modo inédito, 11 novas espécimes vegetais apresentaram resultados positivos para isolados de *Cryptococcus*, sugerindo a ampla distribuição ambiental, ainda por ser definida, deste importante gênero de levedura. Ainda mais relevante, foi o encontro pioneiro do agente mais frequente de criptococose-*C. neoformans*- em um exemplar de *Hymenaea courbaril*, espécime vegetal da ordem *Fabaceae* da família *caesalpinioideae*,

conhecida popularmente no Brasil como jatobá. Desse modo, este estudo permite supor que jatobás podem ser fontes de infecção para criptococose. Importante ressaltar que o tipo molecular de todos os isolados foi o mesmo-VNI que corresponde ao de maior incidência em nosso país (Meyer *et al.*, 2003). O encontro deste tipo molecular tem sido predominante, tanto em isolados clínicos, quanto ambientais, porém, em proporções distintas as diferentes regiões do Brasil (Lazera *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010; Mora *et al.*, 2010). Frente a esses fatos, sugere-se que outros estudos ambientais sejam realizados na cidade de São Paulo para determinar a ocorrência dos outros tipos moleculares de *C. neoformans*, assim como para comprovar a baixa incidência ou ausência de *C. gattii* em nichos desta cidade. Pesquisas recentes, utilizando ferramentas de análise molecular, confirmaram a ocorrência de *C. gattii* em árvores e contribuíram para o conhecimento da distribuição dos distintos tipos moleculares dos agentes etiológicos da criptococose. No Amazonas a pesquisa foi realizada na Ilha de Maracá, por Fortes e colaboradores (2001), com coleta de 260 amostras de raspado de madeira em decomposição e resultado de apenas uma árvore positiva para *Cryptococcus gattii* (*Guettarda acreana*). Em outros países, essa espécie foi identificada a partir de matéria orgânica de alfarroba, pinheiro e eucalipto (Byrnes *et al.*, 2011; Romeo *et al.*, 2011). Vale ressaltar que muitos estudos foram realizados antes do desenvolvimento e disponibilidade de ferramentas de tipagem molecular. Desse modo, muitos isolados não foram discriminados de modo acurado, o que pode ter causado sub notificação da ocorrência de *C. gattii* em amostras coletadas de árvores positivas para *Cryptococcus* spp. (Bernardo *et al.*, 2001).

Este estudo demonstrou a presença concomitante de *C. neoformans* e outra espécie- *C. albidus*- reforçando que o *habitat* desse agente deve estar compartilhado com outras espécies do gênero. Estes achados foram descritos em estudos prévios que comprovaram a coexistência de diferentes espécies do gênero na mesma amostra ambiental (Silva *et al.*, 2004). Esse fato revela um aspecto importante da epidemiologia, desde que, várias espécies do gênero poderiam ser marcadores da presença do agente prevalente da criptococose - *C. neoformans*. Diversos autores lograram isolar espécies de *Cryptococcus*, a

partir de amostras ambientais. No maior estudo do gênero, Baltazar e colaboradores (2008) investigaram, no estado do Espírito Santo, 73 árvores de área urbana, 47 de áreas preservadas e 48 árvores nativas e encontraram 2 isolados de *C. neoformans* e um isolado de *C. laurentii* no mesmo espécime vegetal, sugerindo a possibilidade da existência de marcadores epidemiológicos para os agentes da criptococose em maior ambiente. Em estudo realizado em Uberaba, MG, foi relatado encontro de *Cryptococcus* em 9,5% de 253 amostras de fezes de psitacídeos, havendo concomitância de *C. neoformans* e *C. laurentii* em três dessas amostras (Ferreira-Paim *et al.*, 2010). Em Ribeirão Preto, Silva e colaboradores analisaram excretas de pombos e isolaram 43 amostras de *C. laurentii*, 3 amostras de *C. unigutulatus*, 4 associações de *C. laurentii* com *C. albidus* e uma amostras contendo *C. unigutulatus* e *C. laurentii* (Silva *et al.*, 2004).

Neste estudo, *C. laurentii* foi uma espécie encontrada em distintas amostras de ocos vegetais, indicando extensa distribuição ambiental. Porém, com a implementação taxonômica utilizando a biologia molecular, essa espécie revelou-se um complexo de membros, fenotipicamente, indistinguíveis. De fato, não se tem ainda um detalhamento da dimensão dessas espécies em ambientes naturais. Métodos fenotípicos, freqüentemente, utilizados em laboratório rotina não diferenciam as novas espécies do complexo *C. laurentii* e, portanto, a comparação dos resultados obtidos neste estudo, que revelaram presença de *C. flavescens* e *C. terrestris* em amostras ambientais, não pode ser feita frente a escassos dados de literatura. Apenas o estudo de Ferreira-Paim e colaboradores (2012) descrevem a ocorrência dessas espécies em fenótipos de *C. laurentii* de fezes de aves adjacentes à área hospitalar.

C. humicola encontrado em amostra de oco vegetal neste estudo, nunca foi, segundo literatura consultada, obtida de amostras ambientais e, dado seu potencial oportunista para causar meningite, seu encontro em ambiente frequentado por população urbana, pode ter importância epidemiológica.

O isolamento de espécies de *Cryptococcus* sempre esteve, neste estudo, associado ao encontro de colônias de leveduras pertencentes a outros

gêneros e/ou fungos filamentosos. Com esse achado, pode-se supor a complexidade do biótopo onde se encontra o agente da criptococose e os inúmeros mecanismos de defesa e sobrevivência a que eles estão instigados. Nesse sentido, cresce a relevância do monitoramento contínuo dos agentes da criptococose em tais nichos que propiciam micro-evoluções, podendo resultar em alterações significativas em termos de virulência. De fato, foi comprovado que a cápsula e a melanina, dificultam a fagocitose e a ação oxidante do hospedeiro promove a replicação de *Cryptococcus* spp. dentro de células fagocíticas de amebas de vida livre (Steenbergen e Casadevall, 2000). Espécies saprofíticas de *Acanthamoeba* englobam células de *Cryptococcus* spp, as quais se multiplicam e levam à morte o protozoário. Esses achados foram também observados em estudos com macrófagos, dentro dos quais *Cryptococcus* spp. pode expressar os mesmos mecanismos de defesa, desenvolvidos no meio ambiente. Essas observações sugerem que a virulência de *Cryptococcus* spp. para humanos é uma consequência dos fenômenos adaptativos envolvidos na sua proteção contra predadores de meio ambiente (Steenbergen e Casadevall, 2000). Tais modificações poderiam ter implicações na prática clínica por promoverem formas mais graves da doença ou má resposta ao tratamento com antifúngicos. Neste estudo, observou-se que a produção de melanina pelos isolados de *Cryptococcus* nas culturas primárias apresentou variação (dados não mostrados), sugerindo que esse conhecido fator de virulência deve ser expresso em distintos graus, conforme a necessidade de sobrevivência, o que motiva futuros estudos. A observação de distintos níveis de melanização, também, tem importância na medida em que a um observador inexperiente pode passar despercebida a baixa produção de melanina, resultando em falsos resultados negativos para isolamento de *Cryptococcus*, a partir de amostras de meio ambiente. Vale a pena re-afirmar que todas as colônias com maior ou menor grau de melanização foram retiradas na fase inicial deste estudo. A caracterização fenotípica comprovou a presença de *Cryptococcus*, antes da sua inclusão no estudo.

É importante destacar que alguns autores relataram boa taxa de isolamento dos agentes de criptococose utilizando como objeto de coleta swabs umedecidos com solução salina ou outros. Alguns autores relataram o

isolamento de *Cryptococcus* spp. após fricção de *swab* em fissuras de árvores. (Granados e Castañeda, 2005; Baltazar *et al.*, 2008; Refojo *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010). Neste projeto, foi realizada retirada de material depositado na região central do oco em quantidade adequada, segundo literatura (Lazéra *et al.*, 2000). Dos resultados positivos para *Cryptococcus* neste trabalho, observou-se que os espécimes vegetais que apresentavam grande exposição do lenho no seu tronco (dados não mostrados) permitiram maior isolamento de espécies de *Cryptococcus*. Este fato pode ser devido à natureza decompositora do gênero *Cryptococcus* que está, fortemente, associado ao cerne da árvore, do qual colônias podem ser obidas a qualquer momento, sem sofrer influencia direta do clima local (Fortes *et al.*, 2001). Um aspecto bastante citado na literatura é o de que a matéria orgânica úmida permite alcalinização do substrato orgânico, inibindo o crescimento de *Cryptococcus* (Kwon-Chung, Wickes *et al.* 1992). Assim, em estações úmidas como verão o número de propágulos pode estar em menor concentração que as estações de seca..

Interessante notar que, embora o encontro de *C. neoformans* tenha sido em apenas um espécime vegetal, os diversos isolamentos verificados em coletas sequenciais, nas 3 estações do ano, indicam a permanência do agente nesse local. Essa observação pode ter forte implicação na possível exposição contínua da população a partículas desse agente aumentando a possibilidade de aquisição de infecção.

Uma grande exposição aos propágulos fúngicos pode leva à inalação de carga expressiva, capaz de causar doença (Mitchell e Perfect, 1995; Filiiu *et al.*, 2002). Diante disso a pesquisa dos agentes da cryptocose em amostras de ar mostra-se de grande interesse. A exposição aérea de placas de Petri, contendo meios de cultura, foi em estudos prévios, utilizada como metodologia para avaliar a presença de *Cryptococcus* no ar atmosférico de cidades brasileira (Pedroso *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2005). No entanto, os resultados obtidos por essa técnica estão sujeitos a diversos interferentes, como: ação dos ventos e umidade do ar. Além disso, não é possível definir a concentração de esporos no ar estudado. A contagem e a identificação das colônias na amostra coletada

com impactador de ar, como empregado neste estudo, melhora o desempenho da técnica amostral.

A utilização de coletores por impactação de ar é, amplamente, utilizado para controle de qualidade de ar em ambientes fechados, em particular, residências de pacientes asmáticos e áreas hospitalares (Távora *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2010). A diferença do uso de impactadores de ar e a técnica clássica de exposição de placas de Petri contendo meio de cultura é o controle da quantidade de amostra coletada realizado no aparelho e a distribuição homogênea das partículas aéreas sobre o meio de cultura. O sistema de filtro contido no impactador força a distribuição do ar de forma homogênea sobre toda a superfície do meio, facilitando o crescimento disperso de colônias.

Em contraposição aos achados deste estudo, *C. neoformans* e *C. gattii* já foram encontrados em amostras de ar atmosférico, em estudos cujo objetivo foi o de estudar fontes primárias desses agentes; destaca-se dentre eles o trabalho extenso realizado após o surto de Vancouver, identificando *C. gattii* em múltiplos locais (Hoang *et al.*, 2004). No Brasil, Lazéra e colaboradores (2000) isolaram *C. gattii* (2,08%; 1/48) do ar atmosférico no entorno da árvore *Cassia grandis*. Baroni e colaboradores (2006) isolaram *C. neoformans* de amostras de ar entorno de torres de igrejas, no Rio de Janeiro, descrevendo, ainda, 4,93% (15/304) de positividade para outras espécies de *Cryptococcus* (Baroni *et al.*, 2006). Em Santos, cidade litorânea do estado de São Paulo, Soares e colaboradores (2005) realizaram um estudo com 37 amostras de ar atmosférico ao redor de excrementos de pombos acumulados em solo, sendo que *C. neoformans* não foi isolado, apesar do encontro de *C. albidus* (5,4%). Em Ribeirão Preto, Pedroso e colaboradores (2009) avaliaram 32 de amostras de ar das quais foram isolados: *C. neoformans* (9,4%) de *C. albidus* (9,4%) e *C. laurentii* (6,3%).

Quatro espécies, incluindo *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. humicola* e *C. flavescens* foram identificadas em amostras de ar coletadas neste estudo. Desde que, no estado de São Paulo nenhum estudo utilizou a biologia molecular para diferenciação das espécies crípticas, este estudo permitiu uma

descrição mais acurada da distribuição desses agentes em amostras de ar atmosférico.

Ao lado da caracterização adequada dos agentes presentes em amostras de meio ambiente é fundamental o desenvolvimento de ferramentas que aumentem a sensibilidade da técnica de isolamento de agentes oportunistas. A presença de outros micro-organismos em altas concentrações no mesmo nicho de *Cryptococcus* tem implicação direta na obtenção de culturas puras dos agentes de criptococose. O que se conhece sobre *Cryptococcus* spp. em meio ambiente é o seu biótopo secundário, desde que o estudo da ecologia de agentes fúngico, de modo geral, é complexo. A comunidade fúngica pode ser analisada sob o ponto de vista de características ecológicas, tais como: distribuição geográfica, especificidade de *habitat*, diversidade de espécies e alternância de uma espécie por outra. Outro grupo de características é as de comportamento da comunidade: as inter-relações dentro de uma determinada população, a dinâmica de espécies dentro de uma comunidade e, finalmente, sua função no ecossistema (Fortes *et al.* 2001). As bactérias presentes no solo e ar amostrado foram inibidas pelo tratamento com antibióticos, ou pela ação desses compostos presentes no meio de cultura usados para semeadura das amostras ambientais. A capacidade do gênero *Cryptococcus* em produzir pigmentação pela formação de melanina, em meios contendo compostos fenólicos, foi aproveitada neste estudo aumentando a quantidade de isolamentos a partir das amostras ambientais. Foi utilizado o meio de agar niger, usado para visualização da melanização das colônias de *Cryptococcus* e, assim, promover a distinção entre colônias com características de *Cryptococcus* e aquelas de leveduras não melanizadas. Comprovou-se que é possível a observação de colônias melanizadas ao lado de não melanizadas, facilitando a triagem do gênero *Cryptococcus* e permitindo a separação de outras leveduras, de eventual interesse.

Por outro lado, muitos fungos filamentosos anemófilos têm grande facilidade e rapidez em se desenvolver nos meios de cultivo e, dessa maneira, prejudicam o rendimento de culturas de fungos com menor velocidade de crescimento, como é o caso de *Cryptococcus* spp. Atenção e vigilância

contínua das culturas primárias foram necessárias para obtenção dos isolados de *Cryptococcus*. Leveduras do gênero *Cryptococcus* podem ter crescimento mais lento (>48h) do que a maioria daquelas pertencentes a outros gêneros (>24h) ou, ainda, os fungos filamentosos anemófilos (>24h). Desta forma, o isolamento dos agentes da criptococose em amostras ambientais pode se tornar difícil, conforme a presença de outros grupos de fungos (Lacaz *et al.*, 2002). Neste estudo, a competição pelos nutrientes e espaço no meio de cultura foi uma das grandes dificuldades para isolamento de espécies de *Cryptococcus*, assim como relatado em estudos prévios (Pedroso *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2005). Por exemplo, a amostragem em cada estação do ano permitiu observar que nas amostras coletadas na primavera apresentaram crescimento abundante de fungos filamentosos anemófilos o que dificultou o isolamento de leveduras melanizadas.

A proposta de um novo meio de cultura que retardasse o crescimento de colônias fúngicas foi, diante dessa problemática, um dos objetivos deste estudo. Para incrementar o isolamento de espécies de *Cryptococcus* foi utilizado meio de cultura DRBCm contendo o corante rosa bengala e *dicloran*, que diminui a taxa de crescimento de colônias de fungos de modo geral (King *et al.*, 1979). Esse meio é usado na rotina de laboratórios de análise de alimentos, na contagem de colônias de fungos e foi, pela primeira vez, analisado para pesquisa de fungos de origem ambiental. De fato, foi observado crescimento abundante de fungos filamentosos e leveduras não melanizadas nas placas semeadas com matéria orgânica, ou com ar atmosférico, mas as colônias reduzidas em seu diâmetro permitiram o crescimento concomitante de *Cryptococcus*. Deve ser ressaltado que a composição do meio DRBC não contempla nenhuma substância que possa favorecer na diferenciação de colônias produtoras de melanina. A adição de creatinina e extrato de sementes de niger resolveram muito bem esta questão, resultando em um meio modificado DRBCm contendo estes substratos. A proposta de um novo meio permitiu que as colônias de *Cryptococcus* melanizadas fossem diferenciadas das culturas de fungos filamentosos e outras leveduras não produtoras de melanina, presentes em todas as amostras ambientais; dessa maneira, o novo meio apresenta vantagem dupla em relação aos meios tradicionais.

O estudo quantitativo realizado com os dois meios de cultura permitiu restringir o tamanho das colônias confirmando o melhor desempenho do meio DRBCm em relação ao ágar niger, desde, permitiu a obtenção de maior número de colônias de fungos. Sobre o poder de detecção do DRBCm, verificou-se que colônias foram recuperadas até a concentração mínima de 10^2 . Além disso, o Agar Niger teve poder de detecção 10^4 colônias de *C. neoformans*. Além disso, o meio DRBCm mostrou-se mais adequado para isolamento de leveduras melanizadas a partir de amostras ambientais contendo baixas concentrações (10^2 a 10^3 ufc/mL) de colônias de *Cryptococcus*.

Os resultados do presente estudo evidenciam a diversidade e extensão das fontes ambientais de contaminação por *Cryptococcus* spp. A vigilância sanitária continuada das espécies causadoras de criptococose, juntamente, com a tipagem molecular dos isolados, poderá revelar áreas de colonização permanente e/ou áreas transitória, que representam locais de risco potencial de exposição da população em geral a esses agentes oportunistas.

Neste estudo foi comprovada a presença de espécies de *Cryptococcus* nos cinco parques avaliados em São Paulo, situados nas regiões: norte, sul, leste, sudeste e centro oeste. A partir desse dado, pode-se supor que grandes extensões territoriais são habitadas por membros do gênero *Cryptococcus* sugerindo a possibilidade de dispersão desses agentes em grandes cidades.

Estudos como estes, permitem ainda compreender melhor a ecologia dos agentes da criptocose para planejamento de estratégias de controle dos nichos, com vistas à diminuição da exposição e prevenção da doença. Com os dados resultantes de estudos, realizados em distintas áreas urbanas, autoridades de Saúde Pública podem implantar ou implementar medidas de higienização, sobretudo aquelas que permitam a redução das cargas ambientais destas leveduras nos substratos favoráveis ao seu desenvolvimento.

6. CONCLUSÕES

Observou-se grande distribuição de isolados de *Cryptococcus* em espécimes vegetais de parques na cidade de São Paulo;

Quatro espécies de *Cryptococcus* foram observadas em material orgânico depositado em ocos de árvores, sendo: *C. neoformans*, *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. terrestris*, demonstrando a diversidade ambiental dos agentes de criptococose;

O encontro de *C. albidus* junto a *C. neoformans* sugere a possibilidade de um marcador epidemiológico para o maior agente da criptococose mundial;

C. gatti não foi isolado das espécimes vegetais estudadas, assim com de amostras de ar atmosférico, mostrando a necessidade de futuros estudos para comprovação desse agente nos ambientes estudados;

Em amostras de ar atmosférico as seguintes espécies foram verificadas: *C. laurentii*, *C. humicola*, *C. albidus* e *C. flavescens*, indicando a possibilidade de dispersão aérea dessas espécies;

A dispersão aérea de *C. neoformans*, a partir de nicho positivo, não foi comprovada nas amostras de ar analisadas.

Foi relatado, de modo inédito o encontro de espécies de *Cryptococcus* nas seguintes espécimes vegetais: *Vochysia tucanorum* (Vinheiro); *Cedrela fissilis* (Cedro); *Astronium flaxinifolium* (Aroeira); *Rapanea umbellata* (Capororoca); *Grybotria japônica* (Ameixa amarela); *Machoenium nictitans* (Bico de andorinha); *Spathodea campanulata* (Espatódea); *Plumeria rubra* (Jasmim); *Casuarina cunninghamiana* (casuarina) e *Astronium flaxinifolium* (Aroeira), ressaltando a amplitude de nichos ambientais desses agentes;

O encontro de *C. neoformans* em matéria orgânica de *Hymenaea courbaril* (Jatobá) foi pioneiro;

C. neoformans não foi observado em ampla extensão de nichos, apresentando ocorrência pontual, em apenas um espécime vegetal, mas com permanência expressiva, em três estações do ano, nesse local;

O tipo molecular VNI, o mais frequente em criptococose humana, foi identificado em todos os isolados de *C. neoformans*;

O meio *dicloran* rosa bengala modificado (DRBCm) foi mais adequado e mostrou melhor desempenho do que o meio clássico de ágar niger para isolamento de *Cryptococcus* spp., a partir de amostras orgânicas; *Cryptococcus* spp. pode ser isolado de amostras ambientais contaminadas com outros gêneros de leveduras e fungos filamentosos usando-se DRBCm; o meio DRBCm foi superior na detecção de *C. neoformans* quando em baixas concentrações ($<10^3$ ufc/mL) na matéria orgânica. Recomenda-se, portanto, o uso deste meio na pesquisa ambiental de *C. neoformans* em amostras vegetais;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque PC e Rodrigues ML. Research trends on pathogenic *Cryptococcus* species in the last 20 years: A global analysis with focus on Brazil. *Future Microbiol.* 2012; 7(3), 319–329.

Bailly M P, A Boibieux *et al.* Persistence of *Cryptococcus neoformans* in the prostate: failure of fluconazole despite high doses. *J Infect Dis* 1991; 164(2): 435-436.

Baltazar L M, Ribeiro M A, *et al.* First isolation of *Cryptococcus gattii* from the environment in the State of Espírito Santo *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41(5): 449-453.

Baroni F A, Paula C, *et al.* *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48(2): 71-75.

Barreto de Oliveira M T, Boekhout T, *et al.* *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil *J Clin Microbiol* 2004; 42(3): 1356-1359.
Bernardo FM, Martins HM, Martins ML. Urban sources of *Cryptococcus* spp. Lisboa (Portugal). *Rev Port. Med Vet* 2001;96:157–60.

Bicanic T, Wood R, Bekker LG, Darder M, Meintjes G, Harrison TS. Antiretroviral rollout, antifungal roll-back: access to treatment for cryptococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2001; 5: 530.

Botts MR, Giles SS, Gates MA, Kozel TR, Hull CM. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis. *Eukaryot cell.* 2009; 8(4):595–605.

Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Charbeg J, Frempong T, Isenberg. HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994; 32:452–56.

Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL 2001. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 207-217.

Bulmer, G. Twenty-five years with *Cryptococcus neoformans* *Mycopathologia* 1990; 109(2): 111-122

Byrnes EJ, Bartlett KH, *et al.* *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals *Microbes. Infect* 2011; 13(11): 895-907.

Calvo B, Colombo A, *et al.* Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from

Brazil Chile, and Venezuela. J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2348-2350.

Casadevall A. Antibody-based therapies as anti-infective agents Expert Opin Investig Drugs. 1998; 7(3): 307-321.

CDC. Emergence of *Cryptococcus gattii* – Pacific Northwest, 2004 2010. *Morb Mortal Wkly Rep* 2010; 59: 865–868.

Chaturvedi V, Chaturvedi S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen Costa SPSE, Lazera MS, Santos WRA, Morales BP, Bezerra CCF, Nishiwaka MM, et al First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city Belem, Para, Brazil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 2009; 104(4): 662-64.

Crestani J, Fontes M, et al. Landell *Cryptococcus terrestris*, a tremellaceous, anamorphic yeast phylogenetically related to *Cryptococcus flavescens* Int J Syst Evol Microbiol 2009; 59(Pt três): 631-636.

Currie B, Casadevall A, et al. Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among patients infected with the human immunodeficiency virus in New York City. *Clin Infect Dis* 1994; 19(6): 1029-1033.

Delgado A, Taguchi H, et al. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* from urban and rural areas. *Mycopathologia* 2005; 159(1): 7-11.

Ellis D, Pfeiffer T, et al. Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans* Lancet 1990; 336 (8720) : 923-925.

Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, DJ, Lages-Silva E, Pedrosa AL, Silva PR, et al.; Antifungal Susceptibility, Enzymatic Activity, PCR-Fingerprinting and ITS Sequencing of Environmental *Cryptococcus laurentii* Isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia* 2012; 174:41-52. DOI 10.1007/s11046-011-9500-0.

Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, et al. Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycoses* 2010.

Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Mora DJ, Pedrosa AL Rodrigues V, Silva-Vergara ML. Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba Minas Gerais, Brazil. *Mycoses*. 2011; 54(5): e294–e300.

Ferreira-Paim K, et al., Genetic diversity of environmental *C. laurentii* complex isolates from Brazil. *Mycoses* 2012 5(4):239-40.

Fidalgo O e Bonon V.L. Técnicas de coletas, preservação e herborização de material botânico. Instituto de Botânica, São Paulo. 1984. Manual, N4.

Filiu W F, Wanke B, et al. Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc*

Bras Med Trop 2002; 35(6): 591-595.

Fortes ST, Lazera MS, Nishikawa MM, Macedo RC, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon. 2001; 44:137-40.

Forzza R.C. et.al. (eds.) Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011>>. Acesso em 8 de março de 2012.

Franzot S, Hamdan J, et al. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. J Clin Microbiol 1997; 35(9): 2243- 2251.

Gillece J D, J M Schupp, et al. Whole genome sequence analysis of *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest reveals unexpected diversity. PLoS One 2011; 6(12): e 28550.

Girish Kumar, CP, Prabu D, et al. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from living trees in Guindy National Park, Chennai, South India. Mycoses 2010; 53(3): 262-264.

Goncalves FL, Bauer H, et al. Indoor and outdoor atmospheric fungal spores in the Sao Paulo metropolitan area (Brazil): species and numeric concentrations. Int J Biometeorol 2010; 54(4): 347-355.

Granados D, Castañeda, et al. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. Microb Ecol 2005; 49(2): 282-290.

Groll A, Kolve H, et al. Antifungal agents: in vitro susceptibility testing, pharmacodynamics, and prospects for combination therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004;23(4): 256-270.

Harris JR, Lockhart SR, Debess E, Marsden-Haug N, Goldoft M, Wohrle R. et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: Clinical Aspects of Infection With an Emerging Pathogen. Clinical Infectious Diseases 2011;53(12):1188-95.

Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, and Casadevall A. *Cryptococcus*: From Human Pathogen to Model Yeast. Washington, D.C., ASM Press, 2011; 620pp.

Hoang, LM, Maguire JA, et al. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. J Med Microbiol 2004;53(Pt 9): 935-940.

Hoang,LM, Maguire P, Doyle P, Fyfe M e Roscoe L. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002).; Epidemiology, Microbiology and Histopatology, J. Med Microbiol. 2004; 53:

935b-940.

Horta, J, Staats C, *et al.* Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *Med. Mycol* 2002;40(6): 565-571.

Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA. Fungemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia. *Mycoses*, Berlin, 1998; 41(7-8): 277-280.

King D A Jr, Hocking A D and Pitt J I. *J. Appl. & Environ. Microbiol.* 1979; 37. 959-964.

Kobayashi C, Souza L, *et al.* Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2005;47(4): 203-207.

Kumar CPG, Prabu D, Mitani H, Mikami Y, Menon T. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from living trees in Guindy National Park, Chennai, South India. *Mycoses* 2009;53: 262-264.

Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers *Comput Appl. Biosci* 1994;10(2):189–91

Kwon-Chung K, Polachec I, *et al.* Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* 1982;15(3): 535-537.

Kwon-Chung K, Sorrel T, *et al.* Cryptococcosis: clinical and biological aspects *Med. Mycol* 2000;38 Suppl 1: 205-213.

Kwon-Chung K, Wickes B, *et al.* Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. *Infect Immun* 1992; 60(5): 1869-1874.

Kwon-Chung K J, Polacheck I, and J. E. Bennett. 1982. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Hein-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica*. 9^a. ed. São Paulo: 2002;Sarvier.

Lazera MS, Cavalcanti MA, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* – evidence for a natural habitat related to decaying wood in a porttery tree hollow. *Med Mycol.* 1998;36(2):119-22.

Lazera MS, Cavalcanti SMA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 2000;38:379–83.

Lazera, MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de

- Janeiro, Brazil. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 1993;31:449-454.
- Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology* 2006;8:69-105.
- Litvintseva AP, Lin X. Many globally isolated AD hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* originated in Africa *PLoS Pathog* 2007;3(8):114.
- Lortholary O, Poizat G, *et al.* Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy *AIDS*. 2006;20(17): 2183-2191.
- Lugarini C, Goebel C, *et al.* *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazi. *Mycopathologia* 2008; 166(2): 61-69.
- Machado CC, Amaral A A, Severo L C. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* [online]. 1993, vol.35, n.1, pp. 77-79. ISSN 0036-4665.
- Martins DB, Barbosa ALT, Cavalheiro A, Lopes S.A, Santurio JM, Schossler J.E. & Mazzan A.. Diagnóstico de criptococose canina pela citologia aspirativa por agulha fina. *Ciência Rural*. 2008; 38(3): 826-829.
- Martins MA, Pukinskas SRBS, *et al.* Variedades de cepas de *Cryptococcus neoformans* no Estado de São Paulo: dez anos de estudo multicêntrico. *Rev Instituto Adolfo Lutz* 2003;62(supl 2): 12.
- Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol* 2009;1-14.
- Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda AE, Melhem MSC. IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2003;9: 189-95.
- Meyer W, Marszewska K, Amirmostofina M, Igreja RP, Hardtke C, Methiling K, *et al.* Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by PCR-fingerprinting and RAPD. A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 1999;20:1790-99.
- Mitchel TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS: 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformas*. *Clin Microbiol Rev* Washington, DC.1995 Oct 8 (4):515-548.
- Montenegro H e Paula C. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* and *C neoformans* var *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil *.Med Mycol* 2000;38(5): 385-390.

Mora DJ, Pedrosa AL, Rodrigues V et al. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol* 2010. DOI:10.3109/13693780903358317.

Morera-López, Y, Torres-Rodríguez J. DNA fingerprinting pattern and susceptibility to antifungal drugs in *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* isolates from Barcelona city and rural environmental samples. *Mycopathologia* 2005;160(1): 9-14.

Nigro N T M R C, Pereira A D, Huggins DW, Lacaz C S. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos, do solo e ninhos de pombos. 1987; *Rev. Bras.Med.*, 44, 6-9.

Nishikawa MM, Lazera MS, et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol* 2003;41(1): 73-77.

Osterholzer JJ, Chen GH, et al. Chemokine receptor 2-mediated accumulation of fungicidal exudate macrophages in mice that clear cryptococcal lung infection. *Am J Pathol* 2011;178(1): 198-211.

Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2003; 45(6): 299-305.

Pappalardo MCS, Szeszs MW, Martins MA, Baceti LB, Bonfietti LX, Purisco SU, et al. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time-kill methodology. *Diag Microbiol Infec Dis* 2009; 64:146-51.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 2009; 23(4), 525-530.

Pasa CR. Tipagem molecular e suscetibilidade antifúngica de *Cryptococcus* isolados de pacientes em hospital universitário com investigação domiciliar [Tese]. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul 2011.

Passoni, LFC, Wanke B, et al. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. *Medical Mycology* 1998; 36(5): 305-311

Pedroso R, Ferreira JC, Lavrador, MAS, Maffei CML, Candido RG.. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Microbiol Res* 2009;164(2): 221-227.

Pedroso R, Costa K, et al. Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40(5): 566-568.

Perea S e Patterson T, *et al.* Antifungal resistance in pathogenic fungi. Clin Infect Dis 2002; 35(9): 1073-1080.

Perez C, M Dolande *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*: serotypes in Venezuela Mycopathologia 2008;166(3): 149-153.

Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am. 2002;16(4):837-74. Pfeiffer TJ, Ellis DH. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. J Med Vet Mycol 1992; 30:407–8.

Refojo N, Perrotta D, *et al.* Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. Med Mycol 2009;47(2): 177-184.

Reimão J, Drummond E, *et al.* Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brazil. Mycoses 2007; 50(4): 261-264.

Rezende C, Munhóz CJM, Almeida GG. Investigação Ambiental de *Cryptococcus neoformans* na Cidade de Votuporanga – São Paulo; News Lab 2008 Edição 87.

Ribeiro MA, Ngamskulrunroj P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2008; 50: 315–20.

Romeo O, Scordino F, Criseo G. Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B, VGI/MATalpha strains in southern Italy. Mycopathologia 2011; 171: 423–430.

Rozenbaum R, Goncalves AJ, *et al.* *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. Mycopathologia 1992;119(3): 133-136.

Sambrook J, Maniats T, Fritsch EF. Molecular Clonning. Cold Spring Harbor Laboratory 1989;2.

Sanfelice F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. Ann. Igiene.1894; 4:463–95 .

Santos WR, Meyer W, Wanke B, Costa SP, Trilles L, Nascimento JL, *et al.* Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Para, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103:813–8.

Secretaria Municipal do Verde do Meio ambiente: Centro de Estudos da Metr pole, 2008.p. il.ISBN 978-85-7060-98140-02-51.

Sepe P M. e Gomes S. Indicadores ambientais e gestão urbana: Desafios para a constru o da sustentabilidade na cidade de São Paulo / – São Paulo:

Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, Ryang DW. Electrophoretic Karyotype Analysis of Sequential *Candida parapsilosis* Isolates from Patients with Persistent or Recurrent Fungemia. J Clin Microbiol 2001;39: 1258–63.

Silva JO, Franceschini SA, *et al.* Performance of selective and differential media in the primary isolation of yeasts from different biological samples. Mycopathologia 2004;157(1): 29-36.

Soares M, Paula C, *et al.* Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 2005;47(1): 31-36.

Souza V.C.; Loenzi H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa: Instituto Plantarum 2005; 640p.

Souza LK, Souza Junior AH, Costa CR *et al.* Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. Mycoses 2010; 53: 62–67.

Souza PWG, Abreu DPB, Baroni FA. *Cryptococcus neoformans* isolados de Periplaneta americana recolhidas de ambientes públicos e sua relevância para saúde humana e animal. Revista de Patologia Tropical 2011; Vol. 40 (3): 239-246. jul.-set.

Staib F. Saprophytic life of *Cryptococcus neoformans*. Ann Soc Bel de Méd Trop 1964; 44:611-18.

Steenbergen, J. and A. Casadevall (2000). "Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A) isolates in New York City." J Clin Microbiol 38(5): 1974-1976.

Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, Shinoda T. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. J Clin Microbiol 1999;37(6):1985–93.

Távora L, Gambale W, *et al.* Comparative performance of two air samplers for monitoring airborne fungal propagules. Braz J Med Biol Res 2003;36(5): 613-616. Trends Microbiol 2011; 19(11):564–71

Trilles L, Lazera M, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, *et al.* Regional pattern of the molecular type of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008;5:455–62.

Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazéra M. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex [published online ahead of print 23 Aug] Med Mycol. 2011

Wahington WJ, Stephen A, *et al.* Koneman Diagnóstico Microbiológico. 6ª ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008 1565 p.

Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J (2007) The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe* 1: 263–273.


8. ANEXOS

Anexo 01: Congresso Internacional de Micologia Humana e Animal, Berlim, 2012

Volume 55
Supplement 4
June 2012


mycoses

Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases
Official Publication of Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft
Official Journal of the European Confederation of Medical Mycology




Abstracts of the 18th Congress of the International
Society for Human and Animal Mycology
11–15 June 2012
Berlin, Germany
From Laboratory to Clinic

ISHAM INTERNATIONAL SOCIETY FOR
HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY



An online version is available at
wileyonlinelibrary.com

 WILEY-BLACKWELL

Genetic Diversity of Environmental *Cryptococcus laurentii* Complex Isolates From Brazil

Kennio Ferreira-Paim¹; Thatiana Bragine Ferreira¹; Leonardo Andrade-Silva¹; Fernanda Caroline Silva¹; Delio J Mora¹; André Pedrosa¹; Márcia S. C. Melhem²; Dulcilene Matos² and Mario L Silva-Vergara¹. 1-Infectious Disease Department, Triângulo Mineiro Federal University, Uberaba, Minas Gerais, Brazil. 2-Mycology Department, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil. Email: kenniopaim@gmail.com

INTRODUCTION AND OBJETIVES

The *Cryptococcus* sp. are worldwide distributed and species such as *Cryptococcus laurentii* has been classically considered as saprophytic, although several human cases of cryptococcosis were already reported. *Cryptococcus laurentii* is in fact a complex of species, based on the base composition of its nuclear DNA, the sequence analysis of the Large Subunit of rRNA (LSU-rRNA) and the internal transcribed spacer (ITS) regions.

The aim of this study was to evaluate the intraspecies diversity of environmental *C. laurentii* isolates.

METHODS

A total of 42 Brazilian phenotypically *C. laurentii* strains recovered from different environmental sources were evaluated by the sequencing of the D1/D2 region of the LSU-rRNA.

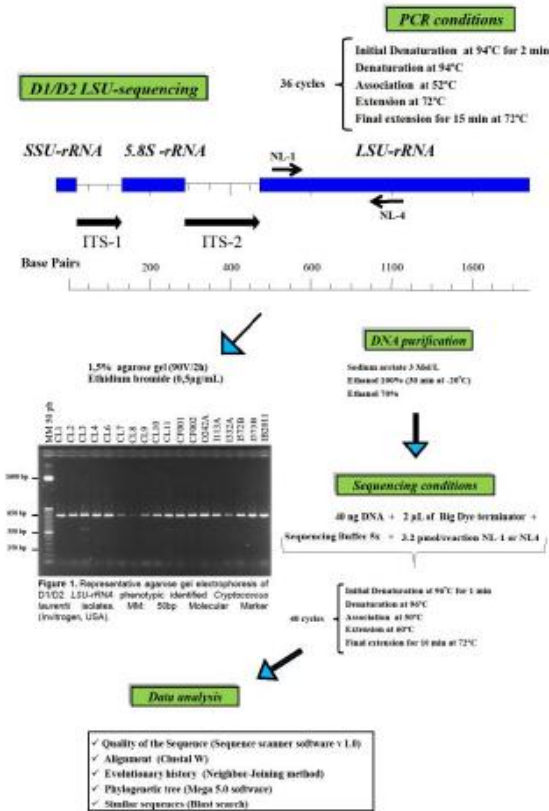


Figure 1. Representative agarose gel electrophoresis of D1/D2 LSU-rRNA phenotypic identified *Cryptococcus laurentii* isolates. MB: 50bp Molecular Marker (Invitrogen, USA).

RESULTS

Thirty-four (80.96%) strains of *C. laurentii*, three (7.14%) *C. flavescens*, three (7.14%) *C. terrestris* and two (4.76%) *C. flavus* were identified through the generated sequences. Overall, the *C. laurentii*, *C. flavescens* and *C. terrestris* isolates presented more similarity with species from phylogenetic group I.

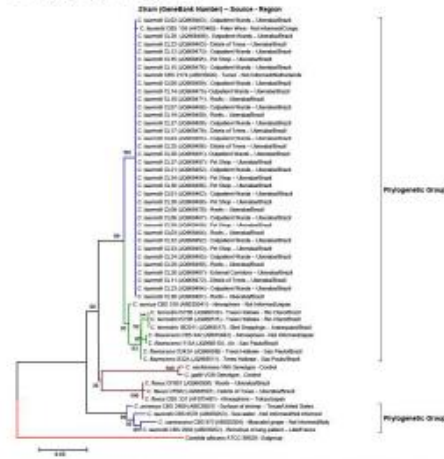


Figure 2. Evolutionary relationships of *Cryptococcus laurentii* environmental isolates. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The optimal tree with the scale of branch length = 0.0010000 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method and are in the units of the number of base substitutions per site. The analysis involved 58 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 397 positions in the final dataset.

Table 1. Blast search of the D1/D2 LSU-rDNA region of the Brazilian *Cryptococcus* species showing similar patterns with several strains around the world.

Brazilian Isolates	March Species (GB Number)	Source	Country	BLAST SEARCH		E Value	Identity
				Total base	Coverage		
<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i> (F11913)	Art House	Texas/USA	994	100	0.0	99%
	<i>C. laurentii</i> (F11914)	Stige Clay Leaf	San Joaquin/USA	987	100	0.0	98%
	<i>C. laurentii</i> (AY133665)	Soil	Colombia/Venezuela	987	100	0.0	98%
<i>C. flavescens</i>	<i>C. flavescens</i> (F260884)	Soil	Shanghai/China	1081	100	0.0	100%
	<i>C. flavescens</i> (F260885)	Stige Clay Soil	San Joaquin/USA	1081	100	0.0	100%
	<i>C. flavescens</i> (F260887)	Acidic Mine	Shanghai/China	1081	100	0.0	100%
<i>C. terrestris</i>	<i>Cryptococcus</i> sp. (G134749)	Soil	Russia/Cape Verde/Algeria	1030	100	0.0	99%
	<i>C. terrestris</i> (F270044)	Soil	Chikilawa/USA	1014	99	0.0	99%
<i>C. flavus</i>	<i>C. flavus</i> (G137691)	Soil	Tanzania/China	1081	99	0.0	99%
	<i>C. flavus</i> (G137711)	Soil	Imagor/China	1137	100	0.0	99%
<i>C. flavus</i>	<i>C. flavus</i> (F270427)	Art House	Texas/USA	1110	100	0.0	99%

COMMENTS

Phenotypic methods frequently used in the laboratory routine may not differentiate species of the *C. laurentii* complex. Here, it was observed an agreement of 80% between the phenotypic and the sequencing of the D1/D2 region.

The similarity observed among Brazilian isolates and those from other geographically distant countries, points out the ubiquitous distribution of the *C. laurentii* complex. Thus, studies including an expressive and representative strains number from different regions of the world may contribute to understand the epidemiological distribution and molecular patterns of this complex.

REFERENCES

*TAKASHIMA, M.; SUGITA, T.; SHINODA, T. et al. Three new contributions from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus communis* and *Cryptococcus jenseni*. *Bull Jpn Microbiol*. v. 55, p. 1157-1184, 2003.

*MANFREDI, R.; FUGARO, C.; SABBATANI, S. et al. Emergence of asymptomatic *Blastomycosis* (*Blastomyces dermatitidis*) shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS. *AIDS Patient Care STDS*. v. 20, p. 227-232, 2006.

*KLEWSZAROWSKA, T.; APARKANTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non-*glabrata* cryptococcal infections: a systematic review. *Infection*. v. 35, p. 51-58, 2007.

*FERREIRA-PAIM, K.; ANDRADE-SILVA, L.; MORA, D. J. et al. Antifungal Susceptibility, Enzymatic Activity, PCR-Fingerprinting and ITS Sequencing of Environmental *Cryptococcus laurentii* Isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*. 2011. doi:10.1007/s11046-011-9590-0.

P460

Multilocus analyses of *Histoplasma capsulatum* isolated of cave-dwelling bats from Mexico reveals a new probable genetic population of this fungal pathogen

J. H. Sahaza,¹ D. A. Estrada-Bárceñas,^{1,2} T. M. Vite-Garín,¹ J. A. Ramírez,¹ G. Rodríguez-Arellanes,¹ A. E. González-González¹ and M. L. Taylor¹

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Microbiología-Parasitología, Facultad de Medicina, México DF, Mexico; ²Instituto Politécnico Nacional, Colección Nacional de Cultivos Microbianos, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, México DF, Mexico

Histoplasma capsulatum isolates from naturally infected bats captured randomly in different caves of Mexico were studied by means of a phylogenetic multilocus analyses using sequence fragments of five molecular markers [arf, H-anti, ole1, tub1, and (GA)_n]. The MEGA vers. 5.0 software generated individual or concatenated trees for the five markers, using the neighbor-joining (NJ) and the maximum parsimony (MP) methods. The NJ and MP trees of the five individual or concatenated markers defined two major groups of *H. capsulatum* isolates. The first group was integrated by most of the isolates from the migratory bat *Tadarida brasiliensis* together with one *H. capsulatum* isolate from *Mormoops megalophylla* (previously described as a lineage). The second group was formed with all *H. capsulatum* isolates obtained from other different bat species (migratory and non-migratory). These

sequence analysis of concatenated spp. trees showed a single core of lineage, we propose a comparative analysis of ITS2 sequences using a RNA secondary structure model.

Our results showed that *M. restricta* (37.5%) are the species more often isolated from individuals with SD while *M. furfur* (46.7%) was frequently isolated from healthy individuals. Moreover, we reported the isolation of *M. gamsatoensis* from a healthy individual, for the first time in Colombia. We found a different phylogenetic signal from ITS secondary structure in relation to primary sequence. Information provided by phylogenetic analysis extends the knowledge about the genetic variability that has this genus.

P462

Genetic diversity of environmental *Cryptococcus laurentii* complex isolates from Brazil

K. Ferreira-Paim,¹ L. Andrade-Silva,¹ D. J. Mora,¹ T. B. Ferreira,¹ F. C. Silva,¹ A. L. Pedrosa,¹ M. S. C. Melhem,² D. M. C. Silva² and M. L. Silva-Vergara¹

¹Triângulo Mineiro Federal University, Internal Medicine, Uberaba, Brazil; ²Adolfo Lutz Institute, Mycology Department, São Paulo, Brazil

Background: The *Cryptococcus* sp. are worldwide distributed and species such as *Cryptococcus laurentii* has been classically considered as saprophytic, despite several human cases of cryptococcosis were already reported. *Cryptococcus laurentii* specie is in fact a complex of

Poster Abstracts

species, due to the base composition of its nuclear DNA and the sequence analysis of the Large Subunit of rRNA (LSU-rRNA) and the internal transcribed spacer (ITS) regions.

Objective: To determine the intraspecies diversity and to identify the phylogenetic groups of *C. laurentii* isolates by sequencing analyses of the D1/D2 LSU rRNA.

Methods: Thirty six and six phenotypic identified *C. laurentii* environmental isolates recovered from Uberaba and São Paulo, Brazil respectively were evaluated. The product obtained with the primers NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') and NL-4 (5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3') was sequenced. The species identification was confirmed using the BLAST system. Then, a phylogenetic comparison was performed using the neighbor-joining method from the evolutionary distance data obtained. Strains sequences of the *C. laurentii* phylogenetic group I and II obtained from the GenBank were used as controls.

Results: Thirty four strains of *C. laurentii*, three *C. flavescens*, three *C. terrestris* and two *C. flavus* were identified through the generated sequences. *Cryptococcus laurentii* species were only identified in 34 out of 36 Uberaba isolates and all of them presented very similar sequences, regardless the place of recovery. The *C. flavescens* isolates presented a maximum identity of 99% and a Query coverage of 100% with other environmental Brazilian, Portuguese and Chinese isolates. Overall, the *C. laurentii*, *C. flavescens* and *C. terrestris* isolates presented most similarity with species from phylogenetic group I, while the *C. flavus* belonged to group II.

Comments: Phenotypic methods frequently used in the laboratory routine may not differentiate species of the *C. laurentii* complex. Here, it was observed an agreement of 80% between the phenotypic and the sequencing of the D1/D2 region. The similarity observed among Brazilian isolates and those from other geographically distant countries, points out the ubiquitous distribution of the *C. laurentii* complex. Thus, studies including an expressive and representative strains number from different regions of the world may contribute to understand the epidemiological distribution and molecular patterns of this complex.

P464

Fusarium species associated with onychomycoses in Colombia.

A. Muñoz,¹ M. Guevara,¹ Y. Amado,¹ L. Bocanegra,¹ L. Sopo,² A. Motta,³ M. Cepero de García,¹ J. Tabima,¹ B. Adriana,¹ S. Restrepo¹ and A. Celis¹

¹Laboratorio de Micología y Fitopatología Uriandes (LAMFU), Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia; ²Laboratorio Especializado de Micología Médica (LEMM), Bogotá, Colombia; ³Universidad El Bosque; Hospital Simón Bolívar, Bogotá, Colombia

As a human opportunistic pathogen *Fusarium* causes a wide spectrum of infections such as onychomycosis and keratomycosis in healthy individuals. Besides, it can cause invasive or disseminated infections in immunosuppressed patients. The prevalence of *Fusarium* spp in superficial lesions as onychomycosis could reach 6%. Furthermore, in disseminated infections the percentage of mortality caused by this pathogen is around 70% to 100%. These rates have been associated with a remarkable therapeutic failure, which in turn depends on the species of *Fusarium* that are isolated and the characterization of the intraspecies complex. In Colombia, previous studies reported *F. solani* and *F. oxysporum* as the species most frequently isolated and the identification was achieved using phenotypic techniques. However, in order to know more about the epidemiology of this genus it is necessary to perform molecular typing of the isolates. Therefore, the aim of this study was to characterize isolates of *Fusarium* spp. from individuals with onychomycosis for determining the presence of complexes within these species.

Positive isolates were processed for phenotypic identification based on microscopic and macroscopic traits (monosporic cultures, PDA and carnation leaf agar growth). Additionally, genotypic identification was performed using the internal transcribed spacer (ITS) and EF-1 alpha regions. To assess phylogenetic relationships, maximum-parsimony, maximum likelihood and bayesian inference assessments were used.

Mic obtained 137 isolates from *Fusarium* spp. *F. solani* (84.0%) and

Apêndice 1 : Meios de cultura utilizados para isolamento de colônias melanizadas

01-Agar niger (Koneman, 2008)

Insumos

Sementes de *Guizzotia abyssinica*: 50 g

Glicose: 1 g

KH₂PO₄: 1 g

Creatinina: 1 g

Ágar: 15 g

Água destilada: 1000 mL

Preparação

1. Adicionar as sementes de *Guizzotia abyssinica* moídas a 1000 mL de água destilada
2. Ferver por 30 minutos
3. Passar por papel filtro e completar o volume com água destilada para 1000 mL
4. Adicionar os ingredientes remanescentes (exceto pelo ágar e os antibióticos) e filtrar
5. Deixar resfriar e ajustar o pH para 5,5
6. Adicionar 7,5 g de ágar para cada 500 mL
7. Autoclavar 120°C por 20 minutos

02- Dicloram rosa bengala modificado (DRBCm)

Insumos

Guizzotia abyssinica: 50 g

Creatinina: 1 g

Frasco de 500g de DRBC agar marca DIFCO®

Preparação

A- Solução de sementes

1. Adicionar as sementes de *Guizzotia abyssinica* moídas a 1000 mL de água destilada
2. Ferver por 30 minutos
3. Passar por papel filtro e completar o volume com água destilada para 1000 mL

B- Outros componentes

1. Adicionar a creatinina à solução de sementes
2. Adicionar 7.5 g de agar para cada 500 ml da solução
3. Autoclavar por a 120°C por 20 minutos

Apêndice 2. Ocorrência de espécies de *Cryptococcus* em ocós de troncos de espécimes vegetais e ar atmosférico, no Parque Trianon.

Caracterização do espécime vegetal					Isolado				
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	Pais	estação	amostra	Número	gênero	espécie
1	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Primavera	AR			
1	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Verão	AR			
1	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Outono	AR			
1	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Inverno	AR	I113A	<i>Cryptococcus</i>	<i>flavescens</i>
1	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Primavera	OCO			
1	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Verão	OCO			
1	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Outono	OCO			
1	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Inverno	OCO			
2	<i>Vochysia</i>	<i>tucanorum</i>	Vinheiro	Brasil	Primavera	AR			
2	<i>Vochysia</i>	<i>tucanorum</i>	Vinheiro	Brasil	Outono	AR			
2	<i>Vochysia</i>	<i>tucanorum</i>	Vinheiro	Brasil	Inverno	AR			
2	<i>Vochysia</i>	<i>tucanorum</i>	Vinheiro	Brasil	Primavera	AR			
2	<i>Vochysia</i>	<i>tucanorum</i>	Vinheiro	Brasil	Verão	OCO			
2	<i>Vochysia</i>	<i>tucanorum</i>	Vinheiro	Brasil	Verão	OCO			
2	<i>Vochysia</i>	<i>tucanorum</i>	Vinheiro	Brasil	Outono	OCO	O122A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
2	<i>Vochysia</i>	<i>tucanorum</i>	Vinheiro	Brasil	Outono	OCO	O122C	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
2	<i>Vochysia</i>	<i>tucanorum</i>	Vinheiro	Brasil	Inverno	OCO			
3	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Primavera	AR			
3	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Verão	AR			
3	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Outono	AR			
3	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Inverno	AR			
3	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Primavera	OCO			
3	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Verão	OCO			

Caracterização da árvore							Isolado		
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	País	Estação	amostra	Número	Gênero	espécie
3	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Inverno	OCO			
4	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Primavera	AR			
4	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Verão	AR			
4	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Outono	AR			
4	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Primavera	AR			
4	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Primavera	OCO			
4	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Verão	OCO			
4	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Outono	OCO	O142C	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
4	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	Brasil	Inverno	OCO			
5	<i>Cedrela</i>	<i>fissilis</i>	Cedro	Brasil	Primavera	AR			
5	<i>Cedrela</i>	<i>fissilis</i>	Cedro	Brasil	Verão	AR			
5	<i>Cedrela</i>	<i>fissilis</i>	Cedro	Brasil	Outono	AR			
5	<i>Cedrela</i>	<i>fissilis</i>	Cedro	Brasil	Inverno	AR			
5	<i>Cedrela</i>	<i>fissilis</i>	Cedro	Brasil	Primavera	OCO			
5	<i>Cedrela</i>	<i>fissilis</i>	Cedro	Brasil	Verão	OCO			
5	<i>Cedrela</i>	<i>fissilis</i>	Cedro	Brasil	Outono	OCO	O151A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
5	<i>Cedrela</i>	<i>fissilis</i>	Cedro	Brasil	Outono	OCO	O151B	<i>Cryptococcus</i>	<i>albidus</i>
5	<i>Cedrela</i>	<i>fissilis</i>	Cedro	Brasil	Inverno	OCO			
6	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	Primavera	AR			
6	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	Verão	AR			
6	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	Outono	AR			
6	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	Inverno	AR			
6	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	Primavera	OCO			
6	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	Verão	OCO			
6	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	<i>NI</i>	Outono	OCO			

Caracterização da árvore							Isolado		
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	Pais	Estação	amostra	Número	Gênero	espécie
6	NI	NI	NI	NI	Inverno	OCO			
7	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	AR			
7	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	AR			
7	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	AR			
7	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	AR			
7	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	OCO			
7	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	OCO			
7	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	OCO			
7	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	OCO			
8	NI	NI	Camboatá	NI	Primavera	AR			
8	NI	NI	Camboatá	NI	Verão	AR			
8	NI	NI	Camboatá	NI	Outono	AR			
8	NI	NI	Camboatá	NI	Inverno	AR			
8	NI	NI	Camboatá	NI	Primavera	OCO			
8	NI	NI	Camboatá	NI	Verão	OCO			
8	NI	NI	Camboatá	NI	Outono	OCO			
8	NI	NI	Camboatá	NI	Inverno	OCO			
9	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	NI	Primavera	AR			
9	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	NI	Verão	AR			
9	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	NI	Outono	AR			
9	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	NI	Inverno	AR			
9	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	NI	Primavera	OCO			
9	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	NI	Verão	OCO			
9	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	NI	Outono	OCO			
9	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	NI	Inverno	OCO			
9	<i>Centrolobium</i>	<i>tomentosun</i>	Araribá	NI	Inverno	OCO			

Apêndice 3. Ocorrência de espécies de *Cryptococcus* em ocós de troncos de espécimes vegetais e ar atmosférico no Parque Horto Florestal

Número	Espécime vegetal				Estação	amostra	isolado		
	Gênero	Espécie	Nome popular	País			número	Gênero	espécie
1	<i>Ocatea</i>	<i>puberula</i>	Canela gosmenta	Brasil	Primavera	AR			
1	<i>Ocatea</i>	<i>puberula</i>	Canela gosmenta	Brasil	Verão	AR			
1	<i>Ocatea</i>	<i>puberula</i>	Canela gosmenta	Brasil	Outono	AR			
1	<i>Ocatea</i>	<i>puberula</i>	Canela gosmenta	Brasil	Inverno	AR	1213A	<i>Cryptococcus</i>	<i>albidus</i>
1	<i>Ocatea</i>	<i>puberula</i>	Canela gosmenta	Brasil	Primavera	OCO			
1	<i>Ocatea</i>	<i>puberula</i>	Canela gosmenta	Brasil	Verão	OCO			
1	<i>Ocatea</i>	<i>puberula</i>	Canela gosmenta	Brasil	Outono	OCO			
1	<i>Ocatea</i>	<i>puberula</i>	Canela gosmenta	Brasil	Inverno	OCO			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	AR			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	AR			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	AR			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	AR			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	OCO			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	OCO			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	OCO			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	OCO			
3	<i>Rapanea</i>	<i>umbellata</i>	Capororoca	Brasil	Primavera	AR			
3	<i>Rapanea</i>	<i>umbellata</i>	Capororoca	Brasil	Verão	AR			
3	<i>Rapanea</i>	<i>umbellata</i>	Capororoca	Brasil	Outono	AR			
3	<i>Rapanea</i>	<i>umbellata</i>	Capororoca	Brasil	Inverno	AR			
3	<i>Rapanea</i>	<i>umbellata</i>	Capororoca	Brasil	Primavera	OCO			
3	<i>Rapanea</i>	<i>umbellata</i>	Capororoca	Brasil	Verão	OCO			
3	<i>Rapanea</i>	<i>umbellata</i>	Capororoca	Brasil	Outono	OCO	0232A	<i>Cryptococcus</i>	
3	<i>Rapanea</i>	<i>umbellata</i>	Capororoca	Brasil	Inverno	OCO			
4	<i>Gryobotria</i>	<i>japonica</i>	Ameixa amarela	Brasil	Primavera	AR			
4	<i>Gryobotria</i>	<i>japonica</i>	Ameixa amarela	Brasil	Verão	AR			
4	<i>Gryobotria</i>	<i>japonica</i>	Ameixa amarela	Brasil	Outono	AR			
4	<i>Gryobotria</i>	<i>japonica</i>	Ameixa amarela	Brasil	Inverno	AR	1243A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>

Espécime vegetal						Isolado			
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	Pais	Estação	amostra	número	Gênero	espécie
4	<i>Gryobotria</i>	<i>japonica</i>	Ameixa amarela	Brasil	I	AR	I243B	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
4	<i>Gryobotria</i>	<i>japonica</i>	Ameixa amarela	Brasil	Primavera	OCO			
4	<i>Gryobotria</i>	<i>japonica</i>	Ameixa amarela	Brasil	Verão	OCO			
4	<i>Gryobotria</i>	<i>japonica</i>	Ameixa amarela	Brasil	Outono	OCO	O242A	<i>Cryptococcus</i>	<i>terrestris</i>
4	<i>Gryobotria</i>	<i>japonica</i>	Ameixa amarela	Brasil	Inverno	OCO	I241A	<i>Cryptococcus</i>	<i>albidus</i>
4	<i>Gryobotria</i>	<i>japonica</i>	Ameixa amarela	Brasil	Inverno	OCO	I242E	<i>Cryptococcus</i>	<i>albidus</i>
4	<i>Gryobotria</i>	<i>japonica</i>	Ameixa amarela	Brasil	Inverno	OCO	I242F	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
5	<i>Ficus</i>	<i>microcarpa</i>	Figueira	Índia	Primavera	AR			
5	<i>Ficus</i>	<i>microcarpa</i>	Figueira	Índia	Verão	AR			
5	<i>Ficus</i>	<i>microcarpa</i>	Figueira	Índia	Outono	AR			
5	<i>Ficus</i>	<i>microcarpa</i>	Figueira	Índia	Inverno	AR			
5	<i>Ficus</i>	<i>microcarpa</i>	Figueira	Índia	Primavera	OCO			
5	<i>Ficus</i>	<i>microcarpa</i>	Figueira	Índia	Verão	OCO			
5	<i>Ficus</i>	<i>microcarpa</i>	Figueira	Índia	Outono	OCO			
5	<i>Ficus</i>	<i>microcarpa</i>	Figueira	Índia	Inverno	OCO			
6	<i>Casuarina</i>	<i>equisetifolia</i>	Casuarina	Austrália	Primavera	AR			
6	<i>Casuarina</i>	<i>equisetifolia</i>	Casuarina	Austrália	Verão	AR			
6	<i>Casuarina</i>	<i>equisetifolia</i>	Casuarina	Austrália	Outono	AR			
6	<i>Casuarina</i>	<i>equisetifolia</i>	Casuarina	Austrália	Inverno	AR			
6	<i>Casuarina</i>	<i>equisetifolia</i>	Casuarina	Austrália	Primavera	OCO			
6	<i>Casuarina</i>	<i>equisetifolia</i>	Casuarina	Austrália	Verão	OCO			
6	<i>Casuarina</i>	<i>equisetifolia</i>	Casuarina	Austrália	Outono	OCO			
6	<i>Casuarina</i>	<i>equisetifolia</i>	Casuarina	Austrália	Inverno	OCO			
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Primavera	AR			
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	AR			
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Outono	AR			
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Inverno	AR	I273A	<i>Cryptococcus</i>	
7	<i>Hymenaea</i>	<i>Courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Primavera	OCO			

Espécime vegetal						Isolado			
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	Pais	Estação	amostra	Número	Gênero	espécie
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272A	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272B	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272C	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272D	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272E	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272F	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272G	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272H	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272I	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272J	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272K	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272L	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272M	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272N	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272O	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272P	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272Q	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272R	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	V272S	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O271 A	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O271B	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O271C	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O271D	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O271E	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O271F	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272A	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272 B	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272C	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272D	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272E	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272F	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>

Número	Espécime vegetal					amostra	Isolado		
	Gênero	Espécie	Nome popular	Pais	Estação		número	Gênero	espécie
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272G	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272H	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272I	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272J	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272K	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272L	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272M	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272N	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272O	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272P	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272Q	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272R	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272S	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272T	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272U	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272V	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272X	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272Z	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272A1	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272B1	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272C1	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272D1	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272E1	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272F1	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272G1	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Verão	OCO	O272H1	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Outono	OCO	O272I1	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Inverno	OCO	I271A	<i>Cryptococcus</i>	<i>albidus</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Inverno	OCO	I271B	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Inverno	OCO	I271C	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Hymenaea</i>	<i>courbaril</i>	Jatobá	Brasil	Inverno	OCO	I271D	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>

Número	Espécime vegetal				Estação	amostra	Isolado		
	Gênero	Espécie	Nome popular	Pais			Número	Gênero	espécie
7	<i>Fabaceae</i>	<i>caesalpinoidene</i>	Jatobá	Brasil	Inverno	OCO	I271E	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Fabaceae</i>	<i>caesalpinoidene</i>	Jatobá	Brasil	Inverno	OCO	I271F	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Fabaceae</i>	<i>caesalpinoidene</i>	Jatobá	Brasil	Inverno	OCO	I271G	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Fabaceae</i>	<i>caesalpinoidene</i>	Jatobá	Brasil	Inverno	OCO	I271H	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Fabaceae</i>	<i>caesalpinoidene</i>	Jatobá	Brasil	Inverno	OCO	I272B	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Fabaceae</i>	<i>caesalpinoidene</i>	Jatobá	Brasil	Inverno	OCO	I272D	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
7	<i>Fabaceae</i>	<i>caesalpinoidene</i>	Jatobá	Brasil	Inverno	OCO	I272H	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
8	<i>Machoenium</i>	<i>nictitans</i>	Bico de andorinha	Brasil	Primavera	AR			
8	<i>Machoenium</i>	<i>nictitans</i>	Bico de andorinha	Brasil	Verão	AR			
8	<i>Machoenium</i>	<i>nictitans</i>	Bico de andorinha	Brasil	Outono	AR			
8	<i>Machoenium</i>	<i>nictitans</i>	Bico de andorinha	Brasil	Inverno	AR	I283A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Machoenium</i>	<i>nictitans</i>	Bico de andorinha	Brasil	Primavera	OCO			
8	<i>Machoenium</i>	<i>nictitans</i>	Bico de andorinha	Brasil	Verão	OCO	V282A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Machoenium</i>	<i>nictitans</i>	Bico de andorinha	Brasil	Outono	OCO	O282A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Machoenium</i>	<i>nictitans</i>	Bico de andorinha	Brasil	Inverno	OCO	I282A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Machoenium</i>	<i>nictitans</i>	Bico de andorinha	Brasil	Inverno	OCO	I282B	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
9	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Primavera	AR			
9	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Verão	AR			
9	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Outono	AR			
9	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Inverno	AR			
9	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Primavera	OCO			
9	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Verão	OCO			
9	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Outono	OCO			
9	<i>Alchornea</i>	<i>sidifolia</i>	Tapiá- guaçu	Brasil	Inverno	OCO			

Apêndice 4. Ocorrência de espécies de *Cryptococcus* em ocos de troncos de espécimes vegetais e ar atmosférico no no Parque Tietê

Espécime vegetal							Isolado		
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	Pais	Estação	amostra	Número	Gênero	espécie
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	AR			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	AR			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	AR			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	AR			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	OCO			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	OCO			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	OCO			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	OCO			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	OCO			
2	<i>Eucalyptus</i>	<i>spp</i>	Eucalipto	Austrália	Primavera	AR			
2	<i>Eucalyptus</i>	<i>spp</i>	Eucalipto	Austrália	Verão	AR			
2	<i>Eucalyptus</i>	<i>spp</i>	Eucalipto	Austrália	Outono	AR			
2	<i>Eucalyptus</i>	<i>spp</i>	Eucalipto	Austrália	Inverno	AR			
2	<i>Eucalyptus</i>	<i>spp</i>	Eucalipto	Austrália	Primavera	OCO			
2	<i>Eucalyptus</i>	<i>spp</i>	Eucalipto	Austrália	Verão	OCO			
2	<i>Eucalyptus</i>	<i>spp</i>	Eucalipto	Austrália	Outono	OCO			
2	<i>Eucalyptus</i>	<i>spp</i>	Eucalipto	Austrália	Inverno	OCO			
3	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Primavera	AR			
3	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Verão	AR			
3	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Outono	AR			
3	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Inverno	AR			
3	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Primavera	OCO			
3	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Verão	OCO			
3	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Outono	OCO			
3	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Inverno	OCO	I332A	<i>Cryptococcus</i>	<i>terrestris</i>
3	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Inverno	OCO	I332B	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
4	<i>Ficus</i>	<i>doliaria</i>	Gameleira	Brasil	Primavera	AR			
4	<i>Ficus</i>	<i>doliaria</i>	Gameleira	Brasil	Verão	AR			

Espécime vegetal							Isolado		
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	Pais	Estação	amostra	Número	Gênero	espécie
4	<i>Ficus</i>	<i>doliaria</i>	Gameleira	Brasil	Outono	AR			
4	<i>Ficus</i>	<i>doliaria</i>	Gameleira	Brasil	Inverno	AR			
4	<i>Ficus</i>	<i>doliaria</i>	Gameleira	Brasil	Primavera	OCO			
4	<i>Ficus</i>	<i>doliaria</i>	Gameleira	Brasil	Verão	OCO			
4	<i>Ficus</i>	<i>doliaria</i>	Gameleira	Brasil	Outono	OCO			
4	<i>Ficus</i>	<i>doliaria</i>	Gameleira	Brasil	Inverno	OCO			
5	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Primavera	AR			
5	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Verão	AR			
5	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Outono	AR			
5	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Inverno	AR			
5	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Primavera	OCO			
5	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Verão	OCO			
5	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Outono	OCO	0352A	<i>Cryptococcus</i>	<i>albidus</i>
5	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Inverno	OCO			
6	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Primavera	AR			
6	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Verão	AR			
6	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Outono	AR			
6	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Inverno	AR			
6	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Primavera	OCO			
6	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Verão	OCO			
6	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Outono	OCO			
6	<i>Astronium</i>	<i>flaxinifolium</i>	Aroeira	Brasil	Inverno	OCO			
7	<i>Caesalpinia</i>	<i>echinata</i>	Pau - brasil	Brasil	Primavera	AR			
7	<i>Caesalpinia</i>	<i>echinata</i>	Pau - brasil	Brasil	Verão	AR			
7	<i>Caesalpinia</i>	<i>echinata</i>	Pau - brasil	Brasil	Outono	AR			
7	<i>Caesalpinia</i>	<i>echinata</i>	Pau - brasil	Brasil	Inverno	AR			
7	<i>Caesalpinia</i>	<i>echinata</i>	Pau - brasil	Brasil	Primavera	OCO			
7	<i>Caesalpinia</i>	<i>echinata</i>	Pau - brasil	Brasil	Verão	OCO			

Espécime vegetal							Isolado		
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	Pais	Estação	amostra	Número	Gênero	espécie
7	<i>Caesalpinia</i>	<i>echinata</i>	Pau - brasil	Brasil	Outono	OCO			
7	<i>Caesalpinia</i>	<i>echinata</i>	Pau - brasil	Brasil	Inverno	OCO			
8	<i>Eucalyptus</i>	spp.	Eucalipto	Austrália	Primavera	AR			
8	<i>Eucalyptus</i>	spp.	Eucalipto	Austrália	Verão	AR			
8	<i>Eucalyptus</i>	spp.	Eucalipto	Austrália	Outono	AR			
8	<i>Eucalyptus</i>	spp.	Eucalipto	Austrália	Inverno	AR			
8	<i>Eucalyptus</i>	spp.	Eucalipto	Austrália	Primavera	OCO			
8	<i>Eucalyptus</i>	spp.	Eucalipto	Austrália	Verão	OCO	V382A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Eucalyptus</i>	spp.	Eucalipto	Austrália	Outono	OCO	O382A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Eucalyptus</i>	spp.	Eucalipto	Austrália	Inverno	OCO	I382A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Eucalyptus</i>	spp.	Eucalipto	Austrália	Inverno	OCO	I382B	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
9	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Primavera	AR			
9	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Verão	AR			
9	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Outono	AR			
9	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Inverno	AR			
9	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Primavera	OCO			
9	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Verão	OCO			
9	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Outono	OCO			
9	<i>Araucária</i>	<i>angustifolia</i>	Pinheiro	Brasil	Inverno	OCO			

Apêndice 5. Ocorrência de espécies de *Cryptococcus* em ocós de troncos de espécimes vegetais e ar atmosférico no Parque Raposo Tavares

Espécime vegetal							Isolado		
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	País	Estação	amostra	Número	Gênero	espécie
1	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Primavera	OCO			
1	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Verão	OCO			
1	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Outono	OCO			
1	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Inverno	OCO	I413A	<i>Cryptococcus</i>	
1	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Primavera	AR			
1	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Verão	AR	V413A	<i>Cryptococcus</i>	<i>humicola</i>
1	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Outono	AR			
1	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Inverno	AR			
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Primavera	OCO			
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Verão	OCO			
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Verão	OCO			
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Verão	OCO			
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Verão	OCO			
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Outono	OCO	O422A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Outono	OCO	O422B	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Inverno	OCO	I422A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Inverno	OCO	I422B	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Primavera	AR			
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Verão	AR			
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Outono	AR			
2	<i>Spathodea</i>	<i>campanulata</i>	Espatódea	Africa	Inverno	AR			
3	<i>Ceiba</i>	<i>speciosa</i>	Paineira	Brasil	Primavera	OCO			
3	<i>Ceiba</i>	<i>speciosa</i>	Paineira	Brasil	Verão	OCO			
3	<i>Ceiba</i>	<i>speciosa</i>	Paineira	Brasil	Outono	OCO			
3	<i>Ceiba</i>	<i>speciosa</i>	Paineira	Brasil	Inverno	OCO			
3	<i>Ceiba</i>	<i>speciosa</i>	Paineira	Brasil	Primavera	AR			
3	<i>Ceiba</i>	<i>speciosa</i>	Paineira	Brasil	V	AR			
3	<i>Ceiba</i>	<i>speciosa</i>	Paineira	Brasil	Outono	AR			

Espécime vegetal							Isolado		
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	Pais	Estação	amostra	Número	Gênero	espécie
4	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Primavera	OCO			
4	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	V	OCO			
4	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	V	OCO			
4	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Outono	OCO			
4	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Inverno	OCO	I441A	<i>Cryptococcus</i>	
4	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Primavera	AR			
4	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Verão	AR			
4	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Outono	AR			
4	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Inverno	AR			
5	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Primavera	OCO			
5	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	V	OCO			
5	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	V	OCO			
5	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Outono	OCO			
5	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Inverno	OCO	I452A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
5	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Inverno	OCO	I452B	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
5	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Primavera	AR			
5	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Verão	AR			
5	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Outono	AR			
5	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Inverno	AR			
6	<i>Eritrina</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Primavera	OCO			
6	<i>Eritrina</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Verão	OCO	V462A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
6	<i>Eritrina</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Outono	OCO			
6	<i>Eritrina</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Inverno	OCO			
6	<i>Eritrina</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Primavera	AR			
6	<i>Eritrina</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Verão	AR	V472B	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
6	<i>Eritrina</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Outono	AR			
6	<i>Eritrina</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Inverno	AR			
7	<i>Plumeria</i>	<i>rubra</i>	Jasmim	México	Primavera	OCO			
7	<i>Plumeria</i>	<i>rubra</i>	Jasmim	México	V	OCO	V472A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
7	<i>Plumeria</i>	<i>rubra</i>	Jasmim	México	Outono	OCO			

Cont.
Apêndi
ce 5

Espécime vegetal							Isolado		
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	Pais	Estação	amostra	Número	Gênero	espécie
7	<i>Plumeria</i>	<i>rubra</i>	Jasmim	México	Inverno	OCO			
7	<i>Plumeria</i>	<i>rubra</i>	Jasmim	México	Primavera	AR			
7	<i>Plumeria</i>	<i>rubra</i>	Jasmim	México	Verão	AR			
7	<i>Plumeria</i>	<i>rubra</i>	Jasmim	México	Outono	AR			
7	<i>Plumeria</i>	<i>rubra</i>	Jasmim	México	Inverno	AR			
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	OCO	P482A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	V	OCO	V482A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	V	OCO			
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	OCO	O482A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	OCO	O482A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	OCO			
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	AR			
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	V	AR	V483B	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	V	AR	V483B	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	AR			
9	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Primavera	OCO			
9	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	V	OCO	V492A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
9	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	V	OCO			
9	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	V	OCO			
9	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	V	OCO	V492C	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
9	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Outono	OCO			
9	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Inverno	OCO			
9	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Primavera	AR			
9	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Verão	AR	V493C	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
9	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Outono	AR			
9	<i>Ligustrum</i>	<i>japonicum</i>	Alfeneiro	Japão	Inverno	AR			

Apêndice 6. Ocorrência de espécies de *Cryptococcus* emocos de troncos de espécimes vegetais e ar atmosférico no parque do Clube AAB

Número	Espécime vegetal				Estação	amostra	Isolado		
	Gênero	Espécie	Nome popular	País			Número	Gênero	espécie
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	OCO			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	OCO			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	OCO			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	OCO			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	AR			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	AR			
1	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	AR			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	AR			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	OCO			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	OCO			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	OCO			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	OCO			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	AR			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	AR			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	AR			
2	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	AR			
3	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	OCO			
3	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	OCO			
3	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	OCO	O731A	<i>Cryptococcus</i>	
3	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	OCO	I731A	<i>Cryptococcus</i>	<i>albidus</i>
3	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	OCO	I731B	<i>Cryptococcus</i>	<i>albidus</i>
3	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	OCO			
3	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	AR			
3	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	AR			
3	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	AR			
3	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	AR			
4	<i>Eugenia</i>	<i>uniflora</i>	Pitangueira	Brasil	Primavera	OCO			
4	<i>Eugenia</i>	<i>uniflora</i>	Pitangueira	Brasil	Verão	OCO			
4	<i>Eugenia</i>	<i>uniflora</i>	Pitangueira	Brasil	Outono	OCO			

Espécime vegetal							Isolado		
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	Pais	Estação	amostra	número	Gênero	espécie
4	<i>Eugenia</i>	<i>uniflora</i>	Pitangueira	Brasil	Inverno	OCO			
4	<i>Eugenia</i>	<i>uniflora</i>	Pitangueira	Brasil	Primavera	AR			
4	<i>Eugenia</i>	<i>uniflora</i>	Pitangueira	Brasil	Verão	AR			
4	<i>Eugenia</i>	<i>uniflora</i>	Pitangueira	Brasil	Outono	AR			
4	<i>Eugenia</i>	<i>uniflora</i>	Pitangueira	Brasil	Inverno	AR			
5	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Primavera	OCO			
5	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Verão	OCO			
5	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Outono	OCO			
5	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Inverno	OCO			
5	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Primavera	AR			
5	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Verão	AR			
5	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Outono	AR			
5	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Inverno	AR	1753A	<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>
6	<i>Casuarina</i>	<i>unninghamiana</i>	casuarina	Brasil	Primavera	OCO			
6	<i>Casuarina</i>	<i>unninghamiana</i>	casuarina	Brasil	Verão	OCO			
6	<i>Casuarina</i>	<i>unninghamiana</i>	casuarina	Brasil	Outono	OCO	0762C	<i>Cryptococcus</i>	
6	<i>Casuarina</i>	<i>unninghamiana</i>	casuarina	Brasil	Inverno	OCO	1762B	<i>Cryptococcus</i>	
6	<i>Casuarina</i>	<i>unninghamiana</i>	casuarina	Brasil	Inverno	OCO	1762C	<i>Cryptococcus</i>	
6	<i>Casuarina</i>	<i>unninghamiana</i>	casuarina	Brasil	Verão	AR			
6	<i>Casuarina</i>	<i>unninghamiana</i>	casuarina	Brasil	Outono	AR			
6	<i>Casuarina</i>	<i>unninghamiana</i>	casuarina	Brasil	Inverno	AR			
7	<i>Erithyna</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Primavera	OCO			
7	<i>Erithyna</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Verão	OCO			
7	<i>Erithyna</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Outono	OCO			
7	<i>Erithyna</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Inverno	OCO			
7	<i>Erithyna</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Primavera	AR			
7	<i>Erithyna</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Verão	AR			
7	<i>Erithyna</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Outono	AR			
7	<i>Erithyna</i>	<i>speciosa</i>	Eritrina	Brasil	Inverno	AR			
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	OCO			
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	OCO			

Espécime vegetal							Isolado		
Número	Gênero	Espécie	Nome popular	País	Estação	amostra	Número	Gênero	espécie
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	OCO			
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	OCO			
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Primavera	AR			
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Verão	AR			
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Outono	AR			
8	<i>Tibochina</i>	<i>granulosa</i>	Quaresmeira	Brasil	Inverno	AR			
9	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Primavera	OCO			
9	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Verão	OCO			
9	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Outono	OCO			
9	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Inverno	OCO			
9	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Primavera	AR			
9	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Verão	AR			
9	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Outono	AR			
9	<i>Tibouchina</i>	<i>mutabilis</i>	Manacá-da-serra	Brasil	Inverno	AR			

A new culture medium for recovering the agents of Cryptococcosis from
environmental sources

Castro e Silva DM, Silva DC, Pukinskas SRBS, Oshida JTU, Oliveira L, Melhem
MSC

Instituto Adolfo Lutz, Secretariat of Health, Government of São Paulo State,
Brazil

Contact information: Dulcilena M. Castro e Silva. Av. Dr. Arnaldo 355. Zip Code
01246002. São Paulo, São Paulo, Brazil. Email: dulmatos.ial@gmail.com

Abstract

The isolation of Cryptococcosis agents from environmental samples may be difficult due to the presence of groups of fast-growing fungi. We propose a new culture medium based on a modification of Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Medium (DRBCm) to detect colonies of *Cryptococcus neoformans*. Our results indicate that DRBCm is superior to the classical bird seed agar in its ability to detect colonies of *C. neoformans*.

Short Communication

Cryptococcosis, which is caused by *Cryptococcus* species, is considered an important systemic mycosis due to its severe pulmonary and central nervous system forms (Perfect and Casadevall, 2002). Most infections by *Cryptococcus* spp. are acquired by inhaling infectious propagules that are present in the environment (Lazera *et al.*, 2000). The association between clinical specimens and environmental samples was demonstrated by molecular studies (Delgado *et al.*, 2005). The environmental isolation of the two main species, i.e., *C. neoformans* and *C. gattii*, in health surveillance studies of the two main species, *C. neoformans* and *C. gattii*, may reveal areas of permanent settlement or transitional areas that are at risk of exposing the population to these agents (Granados and Castañeda, 2005; Baltazar and Ribeiro 2008; Refojo *et al.*, 2009, Kumar *et al.*, 2010).

Although not completely described, the known ecology of *Cryptococcus* spp. present in soil and vegetal materials allows us to speculate that these organisms may contribute to the decomposition of organic material (Yarwood *et al.*, 2010; Fortes and Lazera, 2001).

The presence of other microorganisms in high concentrations in the same environmental niche as *Cryptococcus*, such as filamentous fungi, has direct implications for obtaining pure cultures of the cryptococcosis agents (Lacaz *et al.*, 2002; Pedroso *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2005, Henson, 1981). The ability to simultaneously recover *Cryptococcus* spp. and other organisms depends on several factors, including the techniques and culture media used. Media containing substrates for the phenol oxidase enzyme, which is produced by *Cryptococcus* spp., have long been recommended for this activity. In the 1960, Staib proposed a culture medium containing *Guizotia abyssinica* (niger bird seed) seed extract, which allowed for the presumptive identification of this genre by its brownish pigmentation.

The isolation of some *Cryptococcus* spp. is quite difficult due to the presence of filamentous fungi, that are dispersed in all natural niches and grow quickly in media, thus preventing the growth of yeast colonies. The rapid mold dispersion in the culture medium can be reduced using selective media. The Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar is a special medium for the isolation and enumeration of yeasts and molds and is commonly employed in analyses of food spoilage (King *et al.*, 1979). The compounds present in the medium limit fast-growing mold colonies, thus allowing for the concomitant growth of slow-growing yeasts, such as *Cryptococcus* species. The ability of these genera to produce brown pigments on phenolic substrates could facilitate the visual distinction of colonies on agar medium among other yeast genera.

Ideally, a medium that combines the restriction of airborne fungi colonies while enhancing the brown pigmentation of *Cryptococcus* would enable better the isolation of the agents of cryptococcosis from the environment.

This study proposes an improved medium for isolating *Cryptococcus* spp. from environmental vegetal samples. We propose a modified medium (DRBCm) prepared with an infusion of 50 g of *Guizzotia absynnica* seed in 1000 mL of distilled water containing 2 g of pure creatinine compound and 15 g of DRBC commercially formulated agar.

The performance of the DRBCm was compared to the classic *Guizzotia absynnica* (BSA) agar for recovering *C. neoformans* colonies. For this purpose, we performed two experiments. The first assay employed the artificial inoculation of *C. neoformans* cells into vegetal samples. Five standardized suspensions of *C. neoformans* ATCC 90012 strain-type were prepared and mixed with a single vegetal sample that was divided into four aliquots. Each vegetal aliquot was inoculated with a distinct fungal burden, encompassing 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , and 10 CFU/mL. These inocula were prepared using an initial 10-mL saline suspension containing $0.5\text{-}2.5 \times 10^6$ CFU/mL from a fresh 24-h culture of *C. neoformans* strain-type on Sabouraud dextrose agar.

The second assay used two positive hollow tree materials that were previously analyzed for the presence of *C. neoformans*. One of the positive samples, called the high cryptococcal burden sample, contained 2×10^4 CFU/mL. The other positive sample, called the low cryptococcal burden, contained 1×10^2 CFU/mL. Both the high and low cryptococcal burdens were processed in the same manner. Five grams of each positive sample were resuspended in a 20-mL solution, vortexed for 5 minutes at 150 rpm and centrifuged. Eight milliliters of the supernatant were mixed with a 2-mL solution of streptomycin-penicillin (4.5 mg/mL and 10 mg/mL, respectively). The resulting suspensions were kept for 20 min for bacterial decontamination. Next, a 10- μ L loop was used to inoculate the DRBCm and bird seed agar medium, which were then distributed in 5 dish plates each. All experiments were performed in duplicate, and a negative control vegetal sample was used.

Colony counting was used to quantify the growth of melanized yeast colonies, non-melanized yeast colonies and mold colonies in each inoculated plate. A geometric mean of CFU/mL was obtained for the surface of all BSA and DRBCm medium dish plates. The presence of capsulated *C. neoformans* was confirmed in all melanized yeast colonies before the data were compiled.

Cryptococcus spp. and other genera of yeasts or filamentous fungi are present in the same environmental niches (Steenbergen and Casadevall, 2000). In fact, we found intense fungal growth in both experiments, using artificially inoculated vegetal debris and a naturally infected hollow tree. Both culture media yielded isolated colonies of *C. neoformans* and non-melanized yeast colonies in addition to mold colonies. *C. neoformans* have a laccase,

dipheniloxidase, which converts diphenolic compounds into melanin. The ability of *Cryptococcus* spp. to produce light to dark brown-colored colonies in the DRBCm agar containing creatinin presumptively identifies the genera. Nevertheless, we found at least 3 times as many colonies of *C. neoformans* in DRBCm as were found in the BSA medium (Table 1). Furthermore, the detection limit for DRBCm was 10^2 CFU/mL, which is lower than the limit of 10^3 CFU/mL observed for BSA medium.

Colonies of slower growing yeasts such as *Cryptococcus* could be prevented from growing due to competition for nutrients and space on the media, so we searched for a solution that would allow for the growth of such fungi. When we tested naturally contaminated material with a high cryptococcal burden, we found a higher geometric mean in DRBCm than in the BSA medium for *C. neoformans* (1.8×10^4 CFU/mL and 1.3×10^4 CFU/mL), non-melanized yeasts (0.25×10^4 CFU/mL and 0.08×10^4 CFU/mL), and molds (2.2×10^4 CFU/mL and 0.92×10^4 CFU/mL). For material infected with a low cryptococcal burden seeded in DRBCm and BSA medium, the results were more dramatic because we had no isolation of *C. neoformans* in BSA medium, which contrasted with the geometric mean of 0.6×10 CFU/mL that was verified for DRBCm. We did not obtain any growth of non-melanized yeasts in either medium, and we encountered similar results for molds, i.e., 0.87×10^4 CFU/mL and 0.91×10^4 CFU/mL for the DRBCm and BSA media, respectively. We thought that DRBCm agar, due to its ability to limit the size of the colonies of fast-growing filamentous fungi, could contribute to minimizing this problem. The DRBCm innovation tested in this study allowed colonies of melanized *Cryptococcus* cultures to be easily differentiated in environmental samples. Knowledge of *Cryptococcus* spp. ecology is important for disease management and formulating control strategies in natural niches. With monitoring data available, there may be a need for health authorities to implement hygiene measures, especially measures that reduce the environmental loads of yeast substrates that are favorable to their development.

Colonies of slower growing yeasts such as *Cryptococcus* could be prevented from growing due to competition for nutrients and space on the media, so we searched for a solution that would allow for the growth of such fungi. When we tested naturally contaminated material with a high cryptococcal

burden, we found a higher geometric mean in DRBCm than in the BSA medium for *C. neoformans* (1.8×10^4 CFU/mL and 1.3×10^4 CFU/mL), non-melanized yeasts (0.25×10^4 CFU/mL and 0.08×10^4 CFU/mL), and molds (2.2×10^4 CFU/mL and 0.92×10^4 CFU/mL). For material infected with a low cryptococcal burden seeded in DRBCm and BSA medium, the results were more dramatic because we had no isolation of *C. neoformans* in BSA medium, which contrasted with the geometric mean of 0.6×10 CFU/mL that was verified for DRBCm. We did not obtain any growth of non-melanized yeasts in either medium, and we encountered similar results for molds, i.e., 0.87×10^4 CFU/mL and 0.91×10^4 CFU/mL for the DRBCm and BSA media, respectively. We thought that DRBCm agar, due to its ability to limit the size of the colonies of fast-growing filamentous fungi, could contribute to minimizing this problem. The DRBCm innovation tested in this study allowed colonies of melanized *Cryptococcus* cultures to be easily differentiated in environmental samples. Knowledge of *Cryptococcus* spp. ecology is important for disease management and formulating control strategies in natural niches. With monitoring data available, there may be a need for health authorities to implement hygiene measures, especially measures that reduce the environmental loads of yeast substrates that are favorable to their development.

Table 1. Performance of the DRBCm agar in comparison to BSA agar in recovering *C. neoformans* colonies (CFU/mL)

CFU/mL plated	CFU/mL recovered	
	DRBCm agar	BSA agar
10^5	1.5×10^3	0.5×10^3
10^4	0.8×10^3	0.1×10^3
10^3	0.4×10^3	0
10^2	0.1×10^3	0
10^1	0	0

BSA, BIRD seed Agar; *DRBCm*, Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol agar

References

- Baltazar L M, Ribeiro M A, *et al.* First isolation of *Cryptococcus gattii* from the environment in the State of Espírito Santo Rev Soc Bras Med Trop 2008;41(5): 449-453.
- Delgado A H, Taguchi, *et al.* Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. Mycopathologia 2005;159(1): 7-11.
- Fortes S M, Lazéra *et al.* . First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. Mycoses 2001;44(5): 137-140.
- Granados DP, Castañeda E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992 – 2004. FEMS Yeast Res 2006; 6 : 636 – 644.
- Hensen, 1981. Dichloran as an inhibitor of mould spreading in fungal plating media: effects on colony diameter and enumeration. Appl. Environ. Microbiol., 1981(2), pp. 656–660
- King D A Jr, Hocking A D, Pitt J I. J. Appl. & Environ. Microbiol. 1979;37. 959-964
- Kumar CPG, Prabu D, Mitani H, Mikami Y, Menon T. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from living trees in Guindy National Park, Chennai, South India. Mycoses 2009; 53: 262-264.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Hein-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia Médica. 9ª. ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
- Lazera MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. Med Mycol 2000;38:379–83.
- Pedroso R, Ferreira JC, Lavrador MAS, Maffei CML, Candido RG.. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Microbiol Res 2009;164(2): 221-227.
- Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am. 2002;16(4):837-74, v-vi. [[Links](#)]
- Refojo N, Perrotta D, *et al.* Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. Med Mycol 2009;47(2): 177-184.
- Soares, M, Paula C, *et al.* Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2005;47(1): 31-36.
- Steenbergen J, Casadevall A. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A) isolates in New York City. J Clin Microbiol 2000; 38(5): 1974-1976.
- Yarwood S A, Bottomley P J, *et al.* .Soil microbial communities associated with Douglas-fir and red alder stands at high- and low-productivity forest sites in Oregon, USA. 2010 Microb_Ecol 60(3): 606-617.

First isolation of *Cryptococcus neoformans* genotype VNI
from wood inside hollow trunks of *Hymenaea courbaril*

Castro e Silva DM, Santos DCS, Martins MA, Oliveira L Melhem MSC

Instituto Adolfo Lutz, Secretariat of Health, Government of São Paulo State, Brazil

Contact information: Dulcilena M. Castro e Silva. Av. Dr. Arnaldo 355. Zip Code 01246002.
São Paulo, São Paulo, Brazil. Email: < dulmatos.ial@gmail.com >

Abstract

The natural habitat of Cryptococcosis agents includes hollow trees and the worldwide reported list of tree harboring *C. neoformans* encompass 20 species from 17 genera. We describe the typical Brazilian flora *Hymenaea courbaril* as a new vegetal specimen harboring *C. neoformans* genotype VNI. Tree colonization has been demonstrated summer, autumn and winter seasons with a high (10^2 CFU/g) fungal burden. This ecological study contributes in the epidemiology of relevant pathogenic microorganism since its primary ecological niche is still unclear.

Introduction

The basidiomycete *Cryptococcus* is an opportunist genus that can cause meningitis, primarily in immunocompromised patients with AIDS. The most clinically relevant species are *C. neoformans* (classified into two varieties, *C. neoformans* var. *neoformans* and *C. neoformans* var. *grubii*) and *C. gattii* [1].

Eight major molecular types have been identified within these two pathogenic species: *C. neoformans* is grouped into the molecular types VNI/AFLP1 (serotype A), VNII/AFLP1A (serotype A), VNIII/AFLP2 (serotype AD) and VNIV/AFLP3 (serotype D); *C. gattii* is grouped into molecular types VGI/AFLP4, VGII/AFLP6, VGIII/AFLP5 and VGIV/AFLP7 (serotypes B and C) [2].

Cryptococcal fungal infection is transmitted by the inhalation of contaminated air [3,4]. *Cryptococcus* members can be dispersed in several sources, including fruits, vegetables, soil, insects, honey bees, and decaying wood.

Information on *Cryptococcus* species inhabiting plants may be clinically relevant due to the epidemiological role of these habitats as possible sources of human infection with *C. neoformans* and *C. gattii* [5]. While the major environmental source of *C. neoformans* var. *neoformans* and var. *grubii* is pigeon guano-contaminated soil, *C. gattii* is more commonly isolated from decaying wood [6]. Recent data have shown the presence of *C. neoformans* var. *neoformans* in the hollows of different tree species, suggesting that trees could be a natural habitat. Current information cannot confirm whether *C. neoformans* resides in the same environmental niches as *C. gattii* [7]. This study describes the first documented isolation of *C. neoformans* var. *grubii* from a *Hymenaea courbaril* hollow trunk and reviews the literature.

Materials and methods

We performed an excursion aimed at obtaining information on urban vegetable niches of *C. gattii* in the largest Brazilian city. During a 12-month period, we collected samples from nine trees in one public park in São Paulo city. All trees were located in The Forest Park in an area of 174 hectares in the northern part of São Paulo, Brazil (23.45950 ° S 46.63217° XO). The park offers visitors direct contact with nature, fauna and flora. There are venues for events, picnic areas, a playground, a jogging track, fitness equipment, drinking water fountains, lakes and the Forestry Museum.

Hollow specimens of the following species were sampled quarterly: *Casuarina equisetifolia*, *Alchornea sidifolia*, *Tibouchina granulosa*, *Eriobotrya japonica* (yellow plum), *Rapanea umbellata*, *Machoenium nictitans*, *Ocotea puberula* (gooey cinnamon), *Ficus microcarpa*, and *Hymenaea courbaril*. The inner part of the hollow trunk was scraped (approximately 15 g) with a sterilized spatula and transported in sterile plastic bags to the Reference Mycology Center, Adolfo Lutz Institute, to be processed.

Approximately 10 g of each sample was suspended in 40 mL of sterile saline. After vortexing (2 min), the suspension sat for 10 min. The supernatant was aspirated (8 mL) and mixed with 2 mL of penicillin solution containing 1.2 million IU (4.5 mg/mL)

streptomycin (10 mg/mL) solution. After 15 min, 10 µL of the resultant mixture was transferred to 10 Petri dishes containing bird seed agar (BSA). The plates were incubated at 30°C and observed daily for up to seven days [8,9]. All brown, creamy and mucoid colonies were subcultured on BSA and stored for future phenotypic identification.

The presence of capsule, urease production, positive nitrate reduction test, absent sugar fermentation and typical profile assimilation tests confirmed *Cryptococcus neoformans* identification. Species typing was performed by testing with canavanine-glycine-bromothymol blue (CGB) agar [10].

Molecular typing was determined using *URA5*-RFLP analysis after amplification of the *URA5* gene from high-molecular-weight DNA. The obtained *URA5*-RFLP patterns were visually assigned by comparison with the patterns of the following reference strains: WM 148 (serotype A, VNI), WM 626 (serotype A, VNII), WM 628 (serotype AD, VNIII), and WM 629 (serotype D, VNIV) [11].

Results

Of a total of 9 trees studied, we identified a single *Hymenaea courbaril* tree harboring *C. neoformans* var. *grubii* VNI. Sixty-eight colonies were recovered during summer, autumn and winter from the hollow trunk (Table 1).

Discussion

The classical citation of the presence of encapsulated yeasts in peach juice, which were further classified in the genus *Cryptococcus*, suggested that *Cryptococcus* is not an obligate human pathogen [12]. Furthermore, studies worldwide indicated that the species lifecycle involves bird guano. After more than a century, Ellis and Pfeiffer found *C. gattii* in the plant debris of *Eucalyptus camaldulensis*, followed by other *Eucalyptus* trees in further studies [13-15]. These findings stimulated new studies on decaying wood in the hollow trunks of living trees [16].

A comprehensive review written by Chaturvedi and co-authors (2010) on the period between 1948 and 2008 presented approximately 400 studies, revealing the presence of *Cryptococcus* members in over 50 species of trees belonging to different families and genera [7].

Future research should elucidate the relationship between *C. neoformans* var. *grubii* and host tree specificity.

The majority of studies, including Brazilian data, provide evidence regarding the association of *C. gattii* with living trees [2,17-20]. A few reports have demonstrated that *C. neoformans* var. *grubii* can survive in plants [5,20-22].

The environment in which we conducted this study has high human activity and introduced vegetation. Surprisingly, we isolated *C. neoformans* var. *grubii* from the wood of a hollow trunk in an urban area. *C. neoformans* var. *grubii* has not previously been reported in *Hymenaea courbaril*. Fortes and co-authors (2001) analyzed the inner decaying wood of hollow native jungle trees of several species, including *Hymenaea courbaril*, with no positive results for *Cryptococcus*. [17].

According to Mainieri and Chimelo (1989), the genus *Hymenaea* comprises 13 species occurring throughout the Brazilian territory in both rainforests and dry forests. The species *Hymenaea courbaril* Linnaeus var. *stilbocarpa* (known popularly as jatoba, jatoba-the-woods, sweet beans, and sausage) belongs to the genus *Hymenaea*, family Caesalpinaceae, and order Fabales. It represents the most commercially valuable species, and industrially, there is no difference between species, and they are all known by the common name jatoba.[23].

It appears that the age and health of the tree could influence the maintenance of viable *Cryptococcus* cells. It is possible that the exposure of the inner layer of the plant, which is rich in lignin material, due to injury could promote colonization by yeast cells (Figure 2). The colonization of decaying wood and tree hollows by *C. neoformans* var. *grubii* and var. *neoformans* seems to be enhanced by the ability of wood-rotting fungi to produce laccase, a lignin degradation enzyme. Although there is no evidence that *C. neoformans* var. *grubii* degrades wood by itself, it can survive together with other fungi and

bacteria on wood surfaces. In the continuing search for the main cryptococcosis agent, inhabitants of hollow trees may reveal adaptive mechanisms.

In fact, we observed the deterioration of the wood inside the positive hollow trunk. The wood of *Hymenaea* contains holocellulose (approximately 60%) and lignin (up to 30%), among other components. The higher the holocellulose content, the higher the hygroscopicity of the wood. Cellulose and hemicellulose are most responsible for this property, and lignin plays a minor role [24]. As previously hypothesized, it is the probable niche of yeast, which is not restricted to decay of the tree, and represents a natural biotope. We estimated the *C. neoformans* var. *grubii* density as 10^2 CFU/g in the sample. The population density obtained by Lazera and co-authors [5] from *C. grandis* was higher in comparison to the present study.

Interesting findings were observed regarding the seasonal prevalence of *Cryptococcus* colony recovery. During spring, numerous molds were observed, and no melanized colonies were recovered. In contrast, in summer, we observed the largest number of brown yeast colonies. Regarding the variability of weather, the direct influence of environmental characteristics on recovering *Cryptococcus* was demonstrated, and *Cryptococcus* was more frequently isolated when rainfall decreased [15,21]. Conversely, we found the highest number of cryptococcal colonies in samples collected during summer, which is the rainy season in São Paulo.

According to data obtained in this study we recommend more investigations on the characterization of components of positive hollow trees to determine the basis of plant material being an ecological niche for *C. neoformans* var. *grubii* in addition to bird feces-contaminated soil, which has been reported for many years.

To our knowledge, this is the first study describing the occurrence of *C. neoformans* var. *grubii* in the wood of hollow trunks of *Hymenaea courbaril*. The importance of studies revealing an increase in isolation from native trees around the world could contribute to a better knowledge of the lifecycle of *C. neoformans* var. *grubii* in association with plant material.

Table 1. Colony-forming units of *C. neoformans* var. *grubii* sampled from a hollow trunk of *Hymenaea courbaril*

Collection period	CFU/g
Spring: September 23 to December 21	0
Summer: December 21 to March 21	1.9×10^2
Autumn: March 21 to June 21	0.9×10^2
Winter: June 21 to September 23	0.6×10^2



Fig. 1. Illustration of the hollow trunk of *Hymenaea courbaril* from which *C. neoformans* var. *grubii* was isolated



Fig. 2. The inner stratum of wood that is rich in lignin and could promote *Cryptococcus* growth

References

- Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? FEMS Yeast Res. 2006;6:574–587.
- Trilles L, Lazera M S, Wanke B; Oliveira, R V; Barbosa G G, Nishikawa A M M, Moraes B P, Meyer W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil.. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2008. v. 103, p. 455-462.
- Rad; F S. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon excreta in Qazvin Life Science Journal 2013;10(1)
- Lugarini C, Goebel CS, Condas LA, Muro MD, de Farias MR, Ferreira FM, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. Mycopathologia 2008;166(2):61-9
- Lazera MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. Med Mycol 2000;38:379–83.
- Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, and Casadevall A. *Cryptococcus*: From Human Pathogen to Model Yeast. Washington, D.C., ASM Press, 2011.620pp
- Chaturvedi V, Chaturvedi S *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen Trends Microbiol 2011;19(11):564–71
- Nigro N T M R C, Pereira A D, Huggins DW, Lacaz C S. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos, do solo e ninhos de pombos. 1987;Rev. Bras.Med., 44, 6-9.
- Machado C C, Amaral A A, Severo L C. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo [online]. 1993, vol.35, n.1, pp. 77-79. ISSN 0036-4665.
- Kwon-Chung, K, Wickes B, et al. Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. Infect Immun 1992;60(5): 1869-1874.

Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med Mycol 2009;1-14.

Buschke A. Uber eine durch Coccidien Hervergerufene Krankheit des menschen. 1895 Dtsch. Med. Wochenschr. 21:14

Pfeiffer TJ, Ellis DH. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. J Med Vet Mycol 1992;30:407–8.

Randahawa H, Mussa A , Khan Z. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. 2000 Mycopathologia 151: 63–69.

Granados DP, Castañeda E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992 – 2004. FEMS Yeast Res 2006; 6 : 636 – 644.

Nawange SR, Shakya K, Naidu J, Singh SM, Jharia N, Garg S. Decayed wood inside hollow trunks of living trees of *Tamarindus indica*, *Syzygium cumini* and *Mangifera indica* as natural habitat of *Cryptococcus neoformans* and their serotypes in Jabalpur City of Central India. J Mycol Med 2006;16:63-71.

Fortes ST, Lazera MS, Nishikawa MM, Macedo RCL, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. Mycoses 2001;44:137–40.

Reimão J, Drummond E, et al. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brazil. Mycoses 2007;50(4): 261-264.

Montenegro H, Paula C. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* and *C neoformans* var *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. Med Mycol 2000;38(5): 385-390.

Randhawa HS, Mussa AY, Khan ZU. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. Mycopathologia.2001;151: 63–69.

Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, et al. Seasonal variations in the prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decayed wood inside trunk hollows of diverse tree species in north-western India: a retrospective study. Med Mycol 2010;49:320-3.

Bedi NG, Nawange SR ,Singh SM, Naidu J ,Kavishwar A. Seasonal prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* inhabiting *Eucalyptus tereticornis* and *Eucalyptus camaldulensis* trees in Jabalpur City of Madhya Pradesh, Central India. J Mycol Med. 2012; 22, 341—347.

Mainieri C, Chimelo JP. Fichas de características das madeiras brasileiras. IPT, São Paulo. 1989 418p.

Skaar C. Water in wood. Syracuse: Syracuse University Press, 1972. 218p.