

AISLAMIENTO DE *Cryptococcus neoformans* DESDE MADERA EN DESCOMPOSICION DE *Jacaranda mimosifolia* Y *Enterolobium contortisiliquum*

(Isolation of *Cryptococcus neoformans* from decomposition wood of *Jacaranda mimosifolia* and *Enterolobium contortisiliquum*)

Álvarez C¹., Salim R². y Runco R^{1,2}.

1. Laboratorio de Micología del Hospital del Niño Jesús.
 Pasaje Hungría 750. (4000) Tucumán. R Argentina.

2- Cátedra de Micología. Instituto de Microbiología
 Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán.
 Ayacucho 491- (4000) Tucumán. R Argentina email bqco_chal@hotmail.com

Palabras clave: *Cryptococcus neoformans*, Aislamiento ambiental, Tucumán

Key words: *Cryptococcus neoformans*, Environmental isolation, Tucumán

RESUMEN

El complejo de levaduras patógenas capsuladas *Cryptococcus neoformans* comprende 2 especies: *C. neoformans* y sus 2 variedades y *C. gattii*, que en años recientes fueron halladas en cavidades de troncos de árboles nativos o introducidos. Tales hábitats son potenciales fuentes de infección que deben estudiarse debido a la emergencia de la cryptococcosis en humanos. El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia del complejo *C. neoformans* en árboles vivos de 5 espacios públicos de Tucumán. Mediante hisopado, se recogieron 150 muestras que se inocularon en placas de Agar semillas de Niger, incubadas a 25°C durante 5 días. Solo 2 muestras resultaron positivas para *C. neoformans* con colonias fenoloxidasa positivas, presencia de cápsula con tinta china, termotolerancia a 37°C, ureasa positiva, sensibilidad a cicloheximida a 25 y 37°C y aplicando el método comercial API 20 C Aux. Para identificar especies se utilizó el medio CGB. Se detecta por primera vez en Tucumán, la presencia de esta levadura en los troncos de dos árboles autóctonos de nuestra provincia (*Jacaranda mimosifolia* y *Enterolobium contortisiliquum*).

INTRODUCCION

El complejo *Cryptococcus neoformans*, está integrado por levadura capsuladas, ampliamente distribuidas en la naturaleza. Es capaz de afectar a pacientes inmunocomprometidos causando enfermedades de

ABSTRACT

The pathogenic capsulated yeast *Cryptococcus neoformans* complex includes 2 species: *C. neoformans* and *C. gattii*, which in recent years were found in the cavities of trunks from native or introduced trees. Such habitat become potential sources of infection that should be examined due to the emergence of cryptococcosis in human beings. The purpose of the present paper was to detect the presence of the *C. neoformans* complex in alive trees selected from 5 public places in Tucumán. One hundred fifty samples collected by sprinkling were inoculated in Agar-Niger seed plates, incubated at 25°C for 5 days. Only 2 samples yielded positive for *C. neoformans* together with phenoloxidase positive colonies, presence of capsule with Chinese ink, thermotolerance at 37°C, positive urease, sensitivity to cycloheximide at 25°C and 37°C and applying the API 20C commercial method. To identify species, medium CGB was used. The presence of this yeast is detected for the first time in trunks from two native trees in our province of Tucumán (*Jacaranda mimosifolia* and *Enterolobium contortisiliquum*).

evolución subaguda o crónica, generalmente de pronóstico grave, que se localiza preferentemente en SNC y piel. Las formas meníngeas son las más comunes y graves si no se inicia rápidamente el tratamiento antifúngico específico, observándose, en muchos casos, episodios recidivantes aún con la terapia correcta.

La pandemia del SIDA, elevó drásticamente el número de casos hasta convertirla en una de las micosis emergentes más graves.

Recibido: 1 de Julio 2009

Aceptado: 6 Noviembre 2009

Al no ser una micosis de notificación obligatoria en Argentina, no hay registros históricos que permitan estimar su impacto en la población. Hasta 1985, en el Hospital Muñiz se diagnosticaban en promedio, 2 ó 3 casos por año; el número de casos se elevó a 80 en 1991, y con posterioridad, la incidencia no fue menor a 120 casos por año (Bava *et al.*, 1992, 1997b). En Argentina la incidencia de Cryptococcosis en pacientes con SIDA oscila entre 6-7% (Bava & Negroni, 1992; Bava *et al.*, 1997a; Bava *et al.*, 1997b), en Brasil varía entre 12-18% al igual que en otros países de Sudamérica (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Lazera, *et al.*, 2005). En EEUU y en Europa occidental, la incidencia en los pacientes con SIDA es del 6-10% y en África fluctúa entre 15-30% (Powderly 1993; Mitchell & Perfect, 1995).

El género *Cryptococcus* agrupa 19 especies de las que el principal agente etiológico de cryptococcosis es *C. neoformans* var. *neoformans*. Existen algunos pocos casos descritos en pacientes inmunosuprimidos graves cuyo agente serían *C. albidus* y *C. laurentii*, pero su significado en los aislamientos permanece dudoso y discutido. Sin embargo, a partir del análisis de diferentes genes y estudios de polimorfismo de DNA, se demostró que *C. gattii* pertenece a un grupo monofilético y divergente de la variedad *neoformans* (Boekhout *et al.* 2001; Kwon-Chung *et al.*, 2002; Kwon-Chung & Varma, 2006).

A fin de establecer el ciclo biológico de este hongo y las fuentes de infección en el ser humano por *C. neoformans* en la década de los 50, Emmons (1955) realizó estudios ambientales que determinaban que el acúmulo de deyecciones secas y envejecidas de palomas domésticas (*Columbia livia*), así como los suelos contaminados con estos excrementos, constituyen las fuentes saprofitas de *C. neoformans* en ambientes urbanos (Emmons, 1960-1962). A mediados de los años 80, Saito *et al.* (1984), concluyeron que la exposición de hombres y animales a las heces de estas aves explicaría, en parte, la epidemiología de la cryptococcosis. La característica cosmopolita y ubicua de esta especie, en diferentes ambientes, principalmente en áreas urbanas, fue expuesta en sucesivas investigaciones (Passoni *et al.*, 1998; Lazera *et al.*, 1993, 1996, 2000; Restrepo *et al.*, 2000; Randhawa *et al.*, 2005).

En contraste a las variedades de *C. neoformans* *C. gattii* no ha sido aislado de excretas de aves u otros substratos ricos en nitrógeno, ni del suelo. *C. gattii*, fue aislado por primera vez en Australia (Ellis & Pfeiffer, 1990), en los restos vegetales que rodean a los *Eucalyptus camaldulensis* y otras especies de *Eucalyptus* como *E. tereticornis* (Pfeiffer & Ellis, 1992), *E. blakelyi*, *E. graphocephala* y *E. rudis* (Chakrabarti *et al.*, 1997). La colonización de *C. gattii* no es específica del género

Eucalyptus, otros géneros y especies de árboles como: *Moquilea tormentosa*, *Cassia grandis*, *Ficus* spp., *Guettarda acreana*, *Syzygium cumini*, *Pseudotsuga menziessi*, *Arbutus menziesii*, *Pinus* spp *Acer* spp., entre otros pueden servir como reservorio de la especie *C. gattii*. (Lazera *et al.*, 1998-2000; Fortes *et al.*, 2000; Randhawa *et al.*, 2005; Kidd *et al.*, 2007).

En Argentina, la infección humana por *C. gattii* ha sido reconocida en la forma de meningoencefalitis, tanto en individuos VIH positivos como en VIH negativos, y su agente fue recientemente aislado del medio ambiente en la ciudad de Buenos Aires, no necesariamente asociado a *Eucalyptus* spp. (Davel *et al.*, 2003). Como hasta ese momento se consideraba que la distribución de este agente se encontraba restringida geográficamente, los autores concluyeron que, en estos casos, la infección podría haber sido adquirida fuera de la Argentina (Refojo *et al.*, 2004).

Numerosos estudios proveen nueva información sobre la etiología de la cryptococcosis, demostrando que no sólo *C. gattii* sino también *C. neoformans* tienen la capacidad de adaptarse y sobrevivir en la madera en descomposición de diferentes especies de árboles (Lazera *et al.*, 1993, 1996, 1998, 2000, 2005). *Cryptococcus* tiene la capacidad de producir la enzima *lacasa*, que resulta importante en la degradación de la lignina, ya que jugaría un rol fundamental en la colonización de la madera en descomposición en huecos de los troncos de árboles vivos. (Gonzalez *et al.*, 1989; Williamson, 1994).

Considerando que *C. neoformans* es un importante patógeno humano, y ante los recientes hallazgos mundiales de esta levadura en 22 diferentes especies de árboles autóctonos e introducidos (Restrepo *et al.*, 2000), el presente trabajo está dirigido a la investigación de la presencia del complejo *C. neoformans*, en material recolectado de cavidades de árboles vivos en la ciudad de San Miguel de Tucumán, R. Argentina.

METODOLOGIA

El presente estudio se realizó durante el mes de Marzo de 2008, en el laboratorio de Micología del Hospital del Niño Jesús, Tucumán- R. Argentina.

Se recolectaron 150 muestras del radio urbano de San Miguel de Tucumán a partir de la madera en descomposición presente en cavidades de troncos de diferentes géneros y especies de árboles (*Jacaranda mimosifolia*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Cupania vernalis*, *Grevillea robusta*, *Tabebuia avellanadae* y *Citrus aurantium*), encontrados normalmente en los siguientes espacios públicos: Plaza Bernardino Rivadavia, Plaza Hipólito Irigoyen, Plaza Independencia, Plaza General Justo José de Urquiza y Parque Avellaneda.

Para efectuar la toma de muestras se utilizaron

hisopos estériles humedecidos en solución salina estéril adicionada de Cloranfenicol, 2 g.L⁻¹ antes de su uso.

El muestreo fue realizado mediante hisopado de la superficie interna de los huecos de los árboles. Cada muestra fue inoculada en dos placas Agar-Semillas de Niger (NSA).

Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente. Dado que se observó desarrollo abundante de numerosas colonias de hongos filamentosos de rápido crecimiento, junto a bacterias contaminantes, las placas fueron observadas durante las primeras 48 h y hasta las 96 h. Se estimó numéricamente la cantidad de propágulos del complejo *C. neoformans* existentes en cada muestra positiva, expresada en unidades formadoras de colonias del hongo por hisopado (UFC/hisopado).

Las colonias, de color marrón oscuro, fueron trasplantadas por estriado en placas con NSA para su aislamiento y obtención de subcultivos en medio Sabouraud-Glucosa- Agar (SGA) e incubadas durante 24-48 h a 28°C, para la realización de las pruebas de identificación morfológica y bioquímica. La caracterización micro y macromorfológica de los cultivos, se realizó mediante el análisis de las colonias aisladas en NSA y SGA.

Se emplearon además las siguientes pruebas bioquímicas y fisiológicas: producción de ureasa, sensibilidad a cicloheximida a 25°C y 37°C, termotolerancia a 37°C y pruebas de asimilación de carbono y nitrógeno realizadas por el método comercial API® 20 C Aux (bioMérieux- France) para la identificación a nivel de especie se utilizó el medio Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB).

Para la clasificación a nivel de complejo *C. neoformans* se emplearon las siguientes pruebas bioquímicas y fisiológicas: producción de ureasa, sensibilidad a cicloheximida a 25°C y 37°C, termotolerancia a 37°C y pruebas de asimilación de carbono y nitrógeno realizadas por el método comercial API® 20 C Aux (bioMérieux-France). Para la identificación a nivel de especie se utilizó el medio Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB).

RESULTADOS

Del total de muestras analizadas, 2 (1,3%) fueron encontradas positivas para el complejo *C. neoformans*, con un número de colonias notablemente variable según el microambiente del que fueron aisladas. No se observó desarrollo de colonias fenol-oxidasa positivas en el 98,7% de las muestras restantes. Los aislamientos se obtuvieron en huecos de árboles autóctonos de nuestra provincia, *Jacaranda mimosifolia* (nombre común Tarco) y *Enterolobium contortisiliquum* (Pacará).

El examen microscópico en fresco, con tinta china diluida 1:4, reveló levaduras globosas a ovoides, de 3 a 7 µm de diámetro, capsuladas, generalmente con un único

brote, sin producción de pseudohifas. La observación macroscópica en NSA reveló colonias húmedas, brillantes, de color marrón oscuro debido a la acción de la enzima fenol-oxidasa sobre el sustrato. En SGA se observó el desarrollo de colonias lisas, brillantes, húmedas, de consistencia mucosa, de color blanco-crema. A los 4-5 días el color blanco primitivo se fue oscureciendo al tono canela o pardo. Las colonias aisladas fueron: ureasa (+), Inositol (+), KNO₃ (-), lactosa (-), Maltosa (+), Sacarosa (+), Galactitol (+), pseudomicelio (-), no modificaron el color del CGB.

Las colonias fenol-oxidasa positivas presentaron cápsula y fueron identificadas por las pruebas fisiológicas como pertenecientes al complejo *C. neoformans*. Sólo fue posible realizar el cultivo en medio CGB, de 15 cepas provenientes de ambos árboles, revelando que los aislamientos correspondieron a la especie *C. neoformans*.

En un ejemplar de *J. mimosifolia* se obtuvo un recuento de colonias fenol-oxidasa positivo por placa de NSA de 250 a 285 UFC/hisopo y en *E. contortisiliquum* de 20 a 135 UFC/hisopo lo que reveló altas concentraciones de propágulos del complejo *C. neoformans* en ambos especímenes.

DISCUSION

Nuestros resultados comprueban, por primera vez, en la provincia de Tucumán, el aislamiento del complejo *C. neoformans* a partir de la madera en descomposición de árboles vivos: *Jacaranda mimosifolia* y *Enterolobium contortisiliquum*, autóctonos de nuestra provincia.

Cabe subrayar que, las plazas Rivadavia e Irigoyen, en donde se encuentran ubicados los árboles positivos al complejo *C. neoformans*, son áreas de esparcimiento habitual de los pobladores de Tucumán. Cabe señalar que, debido a su proximidad con el Hospital de Niños, la plaza Rivadavia es frecuentada por pacientes pediátricos ambulatorios que asisten a dicho nosocomio. El aislamiento de esta levadura refleja una potencial fuente latente de adquisición de este agente en pacientes debilitados en nuestra región.

La teoría de la infección latente por *C. neoformans* deriva de un estudio realizado en Francia a pacientes que habían adquirido la infección originariamente 10 años antes mientras residían en África. Todas las cepas aisladas de estos pacientes presentaron diferentes patrones por DNA (RAPD) a los aislamientos clínicos de Europa, América o Asia. (García-Hermoso *et al.*, 1999). Sin embargo, la infección aguda puede presentarse en individuos inmunosuprimidos cuando son expuestos a grandes concentraciones de *C. neoformans*.

Ambas variedades de *C. neoformans* (*neoformans* y *grubii*) aisladas en diferentes regiones geográficas,

muestran diferencias en la prevalencia de las cepas. *C. neoformans* var. *grubii*, es usualmente más prevalente sobre los otros serotipos y pensamos que nuestros aislamientos corresponderían seguramente a esta variedad, a pesar que no pudimos diferenciarlas por serotipos. Un estudio efectuado en el año 1999 en Australia, Nueva Zelanda, Papúa Nueva Guinea, Argentina, Brasil, Estados Unidos, Italia, India, Tailandia y Sudáfrica mostró 356 aislamientos clínicos de los cuales el 96% fueron serotipo A 78% (VNI) y 18% (VNII), 1% serotipo D (VNIII), y 3% serotipo D (VNIV) (Meyer *et al.*, 1999). Si se considera la concordancia existente entre los patrones fenotípicos y genotípicos de los aislamientos clínicos y ambientales de *C. neoformans* (Sorrellet *et al.*, 1996), se refuerza la necesidad de realizar estudios ambientales a fin de hallar potenciales focos de infección de este hongo oportunista.

Las muestras positivas provinieron de material orgánico en un estado avanzado de descomposición, fibroso y descolorido, lo que sugiere la degradación parcial de lignina. En este ambiente, los bioproductos de la madera en descomposición, pueden servir para el crecimiento saprofito de levaduras, incluyendo el complejo *C. neoformans*. Al respecto, (González *et al.*, 1989), encontraron que *C. neoformans* tiene actividad fenoloxidasas, en un sistema lignolítico, primariamente oxidativo y no específico. Nos parece que en este sentido son necesarios otros estudios para evaluar la capacidad de este hongo para degradar polímeros de lignina.

Aunque actualmente persisten muchos interrogantes en cuanto a la ecología del complejo *C. neoformans*, la infección se inicia con la inhalación y establecimiento primario del hongo en el pulmón. La penetración en el alvéolo pulmonar requiere que el tamaño del propágulo sea menor a 2 µm. Está demostrado que los aerosoles con elementos de *C. neoformans* menores a dicho diámetro producen cryptococcosis en animales de laboratorio (Wickes *et al.*, 1996).

Por otra parte, se conoce que las levaduras desecadas pueden ser causantes de la infección. Hasta ahora, no pudo demostrarse la asociación de las basidiosporas de *C. neoformans* (estado teleomorfo) con árboles, las cuales, poseen un diámetro de entre 1,8 y 2 µm, son fácilmente aerosolizables, más virulentas y más resistentes a la desecación, por lo que se las considera propágulos infecciosos eficaces (Wickes *et al.*, 1996; Sukroongreung *et al.*, 1998). Por lo tanto, consideramos que, en los huecos de los árboles donde fue aislado *C. neoformans*, los disturbios originados por el viento o pequeños animales, pueden provocar una fuente de dispersión en el aire y subsecuentemente ser inhalados. Esta premisa, sugiere la necesidad de nuevos estudios epidemiológicos que permitan reconocer la amplitud y distribución de estos nuevos hábitats. A pesar de los estudios realizados *in*

in vitro, las basidiosporas aún no fueron aisladas en el medio ambiente, mientras que el estado levaduriforme de *C. neoformans* es encontrado en heces desecadas de aves, en la vegetación, en el suelo o en los árboles, por lo que la naturaleza del propágulo infeccioso permanece aún en discusión (Lin & Heitman, 2006).

En varios estudios se informó el aislamiento de este hongo en el excremento de aves en cautiverio, como canarios, pericos y otros psitácidos. Estas aves tienen el hábito de raspar y fragmentar pedazos de madera (Kwon-Chung & Bennet, 1992; Passoni *et al.*, 1998). Aunque no observamos la presencia de aves en los huecos de los árboles que resultaron positivos durante el ensayo, no se descarta la presencia de las mismas, lo que permitiría la diseminación de *C. neoformans* en ellos. Es necesario destacar que, paralelamente, en este estudio hemos comprobado la presencia de grandes concentraciones de *C. neoformans* en las deyecciones de palomas en los parques y plazas en las que se realizaron las presentes investigaciones.

Desde los primeros estudios ambientales realizados en la década del 50 por Emmons, hasta nuestros días, existen aún ciertos aspectos del ciclo biológico de *C. neoformans* que no están totalmente esclarecidos.

REFERENCIAS

- Bava, A. J. & Negroni, R. (1992). The epidemiological characteristics of 105 cases of Cryptococcosis diagnosed in the Republic of Argentina between 1981-1990. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 34:335-340
- Bava, A.J.; Robles, A.; Negroni, R.; Archavala, A.; Bianchi, M. (1997a). Estudio de algunos aspectos epidemiológicos de 253 casos de Cryptococcosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 14:111-114
- Bava, A.J.; Negroni, R.; Archavala, A.; Robles, A.M.; Bianchi, M. (1997b). Cryptococcosis associated with AIDS in the Muñiz Hospital of Buenos Aires. *Mycopathologia.* 40:13-17
- Boekhout, T.; Theelen, B.; Diaz, M.R.; Fell, J.W.; Hop, W.C.J.; Abein, E.C.A.; Dromer, F.; Meyer, W. (2001). Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol.* 147:891-907
- Chakrabarti, A.; Jantana, M.; Kumar, P.; Chatha, L.; Kaushal, A.; Padhye, A.A. (1997). Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. *Journal Clin Microbiol* 35:3340-3342
- Davel, G.; Abrantes, R.; Brudny, M.; Córdoba, S.; Roder, L.; Canteros, C. E.; Perrotta, D. (2003). Primer aislamiento ambiental de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en Argentina. *Rev. Arg. Microbiol.* 35:110-112
- Ellis, D.H. & Pfeiffer, T.J. (1990). Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal Clin. Microbiol.* 28:1242-44
- Emmons, C.W. (1955). Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *American*

Journal of Hygiene 62:227-232

Emmons, C.W. (1960). Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. Public Health Reports 75:626-364

Emmons, C.W. (1962). Natural occurrence of opportunistic fungi. Laboratory Investigation Baltimore 11:1026-1032

Fortes, S.T.; Lazera, M.S.; Nishikawa, M.M.; Macedo, R.C.; Wandke, B. (2001). First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. Mycoses 5:137-140

García-Hermoso, D.; Janbon, G. & Dr omer, F. (1999). Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. J. Clin. Microbiology 37:3204-9

Gonzalez, A.E.; Mar tinez, A.T.; Almendr os, G.; Grinbergs, J. (1989). A study of yeasts during the delignification and fungal transformation of wood into cattle feed in Chilean rain forest. Antonie van Leeuwenhoek 55:221-36

Kidd, S.E.; Chow , Y.; Mak, S.; Bach, M.P .; Chen, H.; Hingston, A.O.; Kronstad, J.W.; Bartlett, K.H. (2007). Characterization of Environmental Sources of Human and Animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. Applied and Environmental Microbiology 73:1433-1443

Kwon-Chung, K.J. & Varma, A. (2006). Do major species concept support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*. FEMS yeast Res. 6:574-587

Kwon-Chung, K.J. & Bennet, J.E. (1992). Cryptococcosis. En Kwon-Chung, K.J., Bennet, J.E. (Ed) Medical Mycology , Lea & Febiger, Philadelphia, p. 397-446

Know-Chung, K.J.; Boekhout, T.; Fell, J.W . & Diaz, M. (2002). Proposal to converse the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurians* and *C. ballisporus* (Basidiomycota Hymenomycetes, Tremellomycetidae). Taxon 51:804-806

Lazera, M.S.; Wanke, B. & Nishikawa, M.M. (1993). Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. J. Med. Vet. Mycol. 31:449-454

Lazera, M.S.; Pir es, F.D.A.; Camillo-Coura, L.; Nishikawa, M.M.; Bezerra, C.C.F .; Trilles, L.; Wanke, B. (1996). Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. J. Med. Vet. Mycol. 34:127-131

Lazera, M.S.; Cavalcanti, M.A.S.; Trille,L.; Nishikawa M.M.; Wanke, B. (1998). *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. J. Med. Mycol. 36:119-122

Lazera, M.S.; Cavalcanti, M.A.S.; Londer o, A.T.; Trilles, L.; Nishikawa, M.M.; Wanke, B. (2000). Possible primary niche of *Cryptococcus neoformans*. Med. Micol. 38:379-383

Lin, X. & Heitman, J. (2006). The Biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Annual Review of Microbiology 60:69-105

Lazera, M.S.; Gutierrez-Galhardo, M.C.; Cavalcanti, M.A.S. & Wanke, B. (2005). Criptococose. In: Coura, José Rodrigues. (Org.). Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1. ed. Rio de Janeiro, v. II, p. 1223-1235

Meyer, W.; Castaneda, A.; Jackson, S.; Huynh, M.; Castaneda, E. (2003). Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg. Infect. Dis. 9:189-95

Mitchell, T. G. & Perfect, J.R. (1995). Cryptococcosis in the era of AIDS, 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 8:515-548

Passoni, L.F .C.; Wanke, B.; Nishikawa, M.M. & Lazera, M.S. (1998). *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without Cryptococcosis. Med. Mycol. 36:305-311

Pfeiffer, T.J. & Ellis, D.H. (1992). Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. Journal Med. Vet. Mycol. 30:407-408

Powderly, W.G. (1993). Cryptococcal meningitis and AIDS. Clin. Infect. Dis. 17:837-842

Randhawa, H.S.; Kowshik, T. & Khan, Z.U. (2005). Efficacy of swabbing versus a conventional technique for isolation of *Cryptococcus neoformans* decayed wood in tree trunk hollows. J. Medical Mycology 43:67-71

Restrepo, A., Baumgardner, D.J., Bagagli, E. (2000). Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. Med. Mycol. 38:67-77

Refojo, N.; Brudny, M.; Abrantes, R.; Abrantes, H.; Davel, G.; Perr otta, D. (2004). Variedades de *Cryptococcus neoformans* en árboles de plazas de la Ciudad de Buenos Aires. XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología. Ciudad de Buenos Aires.

Sorell, T. C.; Chen, S.C.; Ruma, P .; Meyer, W.; Pfeiffer, T.J., (1996). Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 34:1253-60

Staib, F., Schultze-Dieterich, L. (1984). *Cryptococcus neoformans* in fecal matter of bird kept in cages - control of *Cryptococcus neoformans* habitats. Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde 174:79-186

Staib, F.; Seibold, M.; Antweiler, E.; Fröhlich, B.; Weber, S.; Blisse, A. (1987). The brown color effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]. Aug; 266:167-77

Sukrong, S.; Kitinyom, K.; Nilakul, C., & Tantimavanich, S. (1998). Pathogenicity of *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*. Med. Mycol. 36:419-424

Wicks, B.L.; Mayorga, M.E.; Edman, U. & Edman, J.C. (1996). Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: Association with the α -mating type. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:7327-7331

Williamson, P .R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a laccase. J. Bacteriology 176:656-664